

SÉRIE A - N° Série 1404

N° D'ORDRE

2269

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Suzanne LAMBIN

Pharmacien.

Ex-interne lauréat des Hôpitaux de Paris.
Assistante à la Faculté de Pharmacie de Paris.

1^{re} THÈSE. — MÉTHODES DE MESURE DE L'ACTIVITÉ ANTI-MICROBIENNE DES SUBSTANCES CHIMIQUES.

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le **2 JUIN 1933** devant la Commission d'examen.

MM. PORTIER *Président.*

GUILLIERMOND
JAVILLIER } *Examineurs.*

MASSON ET C^{IE}, ÉDITEURS

LIBRAIRES DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE

120, BOULEVARD SAINT-GERMAIN, PARIS (VI^e)

1933

MÉTHODES DE MESURE
DE
L'ACTIVITÉ ANTIMICROBIENNE
DES
SUBSTANCES CHIMIQUES



Digitized by the Internet Archive
in 2026

SÉRIE A - N° Série 1404

N° D'ORDRE
2269

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Suzanne LAMBIN

Pharmacien.
Ex-interne lauréat des Hôpitaux de Paris.
Assistante à la Faculté de Pharmacie de Paris.

1^{re} THÈSE. — MÉTHODES DE MESURE DE L'ACTIVITÉ ANTI-MICROBIENNE DES SUBSTANCES CHIMIQUES.

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le

1933 devant la Commission d'examen.

MM. PORTIER *Président.*

GUILLIERMOND. }
JAVILLIER } *Examineurs.*

MASSON ET C^{IE}, ÉDITEURS

LIBRAIRES DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE
120, BOULEVARD SAINT-GERMAIN, PARIS (VI^e)

1933

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

MM.

<i>Doyen</i>	C. MAURAIN, <i>Professeur</i> , Physique du globe.		
<i>Doyen honoraire</i>	M. MOLLIARD.		
	H. LE CHATELIER.		
	H. LEBESGUE.		
	A. FERNBACH.		
<i>Professeurs honoraires</i> ...	A. LEDUC.		
	Émile PICARD.		
	Rémy PERRIER.		
	Léon BRILLOUN.		
	A. DEREIMS.		
	E. GOURSAT	Analyse supérieure et algèbre supérieure.	
	P. JANET	Electrotechnique générale.	
	F. WALLERANT	Minéralogie.	
	P. PAINLEVÉ	Mécanique analytique et mécanique céleste.	
	M. CAULLEY	Zoologie (Évolution des êtres organisés).	
	Émile BOREL	Calcul des probabilités et Physique mathématique.	
	H. ABRAHAM	Physique.	
	M. MOLLIARD	Physiologie végétale.	
	E. CARTAN	Géométrie supérieure.	
	Gabriel BERTRAND	Chimie biologique.	
	Jean PERRIN	Chimie physique.	
	L. LAPICQUE	Physiologie générale.	
	M ^{me} P. CURIE	Physique générale et radio-activité.	
	G. URBAIN	Chimie générale.	
	L. MARCHIS	Aviation.	
	E. VESSIOT	Théorie des fonctions et théorie des transformations.	
	A. COTTON	Physique générale.	
	J. DRACH	Application de l'analyse à la géométrie.	
	Charles FABRY	Physique.	
	R. LESPIEAU	Théories chimiques.	
	P. PORTIER	Physiologie comparée.	
	Charles PÉREZ	Zoologie.	
<i>Professeurs</i>	E. BLAISE	Chimie organique.	
	P.-A. DANGEARD	Botanique.	
	Léon BERTRAND	Géologie structurale et géologie appliquée.	
	E. RABAUD	Biologie expérimentale.	
	G. JULIA	Calcul différentiel et calcul intégral.	
	Paul MONTEL	Mécanique rationnelle.	
	V. AUGER	Chimie appliquée.	
	P. WINTREBERT	Anatomie et histologie comparées.	
	O. DUBOSCQ	Biologie maritime.	
	Eugène BLOCH	Physique théorique et physique céleste.	
	L. LUTAUD	Géographie physique et géologie dynamique.	
	Henri VILLAT	Mécanique des fluides et applications.	
	Ch. JACOB	Géologie.	
	P. PASCAL	Chimie minérale.	
	E. ESCLANGON	Astronomie.	
	H. BÉNARD	Mécanique expérimentale des fluides.	
	C. MAUGUIN	Minéralogie.	
	L. BLARINGHEM	Botanique.	
	A. GUILLIERMOND	Botanique (P. C. N.).	
	A. DENJOY	Mathématiques générales.	
	A. DUFOUR	Physique (P. C. N.).	
	H. BÉGHIN	Mécanique physique et expérimentale.	
	DE BROGLIE	Théories physiques.	
E. PÉCHARD	Chimie (Enseig. P. C. N.).	FOCH	Mécanique expérimentale des fluides.
A. GUILLET	Physique.	PAUTHENIER	Physique (P. C. N.).
M. GUICHARD	Chimie minérale.	VILLEY	Mécanique physique et expérimentale.
A. MICHEL-LÉVY	Pétrographie.	LABROUSTE	Physique du Globe.
H. MOUTON	Chimie physique.	FREUNDLER	Chimie (P. C. N.).
L. DUROYER	Optique appliquée.	PRENANT	Zoologie.
M. JAVILLIER	Chimie biologique.	P. JOB	Chimie générale.
ROBERT-LÉVY	Zoologie.	CHRÉTIEN	Optique appliquée.
A. DEBIERNE	Radio-activité.	BOHN	Zoologie (P. C. N.).
E. DARMOIS	Physique.	COMBES	Sciences naturelles (P. C. N.).
G. BRUHAT	Physique.	GARNIER	Mécanique rationnelle.
F. PICARD	Zoologie (Évolution des êtres organisés).	PÉRES	Mécanique des fluides.
	Paléontologie.	LAUGIER	Physiologie générale.
L. JOLEAUD	Calcul des Probabilités et Physique mathématique.	TOUSSAINT	Technique aéronautique.
M. FRÉCHET		HACKSPILL	Chimie (P. C. N.).
M ^{me} RAMART-LUCAS	Chimie organique.	M. CURIE	Physique (P. C. N.).
<i>Secrétaire</i>		A. PACAUD	
<i>Secrétaire honoraire</i>		D. TOMBECK	



A MA FAMILLE

A MES AMIS

A MONSIEUR LE PROFESSEUR RADAIS

Doyen honoraire de la Faculté de Pharmacie,
Membre de l'Académie de Médecine.

Hommage de gratitude et de profond respect.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR PORTIER

Membre de l'Académie de Médecine,
Professeur à la Faculté des Sciences et à
l'Institut Océanographique.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR GUILLIERMOND

Professeur à la Faculté des Sciences.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR JAVILLIER

Professeur à la Faculté des Sciences
et au Conservatoire des Arts et Métiers.

*Qui ont bien voulu faire partie du jury de
cette thèse.*

*Hommage respectueux de
ma profonde gratitude.*

A MONSIEUR LE PROFESSEUR AGRÉGÉ J. RÉGNIER

Pharmacien des Hôpitaux.

*Qui m'a inspiré le sujet de cette thèse
et n'a cessé de me guider dans mon
travail.*

*En faible témoignage de ma
profonde reconnaissance et de
mon entier dévouement.*

INTRODUCTION

Avec la découverte des microbes et la mise en évidence de leur rôle pathogène s'est imposée la nécessité de détruire ces germes, ou, tout au moins, de les rendre inoffensifs. On a donc pensé, assez vite, à utiliser dans ce but les propriétés désinfectantes des corps chimiques. Depuis, et malgré les progrès réalisés par l'asepsie, le rôle des agents microbicides n'a fait que s'accroître. Aux désinfectants anciennement connus (sublimé, acide phénique, chlore, iode...), et depuis longtemps utilisés pour détruire les microbes dans la nature ou dans les parties facilement accessibles du corps humain, est venue s'ajouter une longue liste de produits synthétiques. Par ailleurs, la clinique moderne a étendu son champ d'action. Ne se bornant plus à traiter les parties externes mortifiées de l'organisme, elle a tenté d'atteindre également les germes pathogènes responsables des septicémies et de toutes les localisations internes. Ainsi ont pris naissance d'autres produits chimiques, pour certains desquels on peut prévoir, dès à présent, mieux qu'un succès passager.

Pour toutes ces substances microbicides, des essais préliminaires, effectués au laboratoire, ont dû nécessairement précéder l'introduction parmi les agents thérapeutiques usuels. Ce sont ces essais préliminaires que nous étudierons ici.

Certes, nous savons qu'il est presque impossible de déduire directement des expériences effectuées *in vitro* la valeur thérapeutique des substances antimicrobiennes. L'impossibilité de réaliser exactement au laboratoire les conditions d'action existant dans l'organisme nous interdit des conclusions trop hâtives. Pourtant, il est indéniable que les essais *in vitro* constituent une base nécessaire pour l'étude de la valeur thérapeutique de ces substances. Là, comme bien souvent ailleurs, nous avons profité à aller du plus simple au plus complexe. Procéder autrement, c'est-à-dire essayer directement sur l'homme ou sur l'animal les produits créés par le chimiste, c'est risquer d'administrer des substances nuisibles pour l'organisme et parfois sans action sur les germes.

C'est, de plus, compromettre la netteté du résultat cherché, en faisant agir simultanément les diverses propriétés, encore inconnues, des corps étudiés.

Tout en constatant la nécessité pour le *thérapeute* de compléter l'essai *in vitro* par des expériences sur l'animal, nous considérons donc cet essai *in vitro* comme nécessaire, même pour les substances destinées à agir dans l'organisme animal lui-même. A plus forte raison, cet essai nous paraît-il indispensable pour l'*hygiéniste*, qui, lui, doit apprécier la valeur germicide des corps chimiques dans les conditions mêmes qu'il rencontrera dans son œuvre. Remarquons, en outre, que cet essai *in vitro*, rapide et peu coûteux, permet également au *chimiste* de se diriger facilement dans ses recherches synthétiques.

Enfin, dans un domaine plus théorique, nous voyons que l'action antimicrobienne figure parmi les plus simples épreuves de toxicité que l'on puisse instituer sur la matière vivante. Par là, l'essai *in vitro*, effectué sur des êtres unicellulaires, dans des conditions presque toutes assez bien définissables, permet au biologiste d'embrasser les phénomènes qui règlent les échanges entre les cellules et le milieu environnant, d'une manière plus efficace qu'en s'adressant à des organismes plus complexes.

C'est pourquoi, ayant eu à déterminer la valeur antimicrobienne de certaines substances chimiques, nous nous sommes adressée, en premier lieu, à l'essai *in vitro*.

Pour qui le regarde de loin, le problème peut paraître simple. En fait, et dès le début, nous nous sommes trouvée, dans l'accomplissement de notre tâche, en présence d'une grande difficulté. Il n'existe pas en France de méthode, couramment employée, pour la mesure des pouvoirs antiseptiques. Par ailleurs, les nombreuses méthodes d'essai proposées dans les pays étrangers, dont certaines mêmes y sont devenues officielles, ne nous donnaient pas entière satisfaction. C'est pourquoi, sur les conseils et sous la direction de M. J. Régnier, nous avons entrepris de rechercher quelles conditions doit remplir une méthode d'essai général des substances chimiques germicides pour présenter le maximum de garanties. Disons tout de suite qu'il est fort difficile de mettre au point une méthode exempte de tout reproche. En effet, d'une part, le mécanisme de l'action désinfectante est encore mal connu, et, d'autre part, il met en jeu des éléments vivants en continuelle évolution, et de résistance sans cesse variable.

Nous n'avons donc pas la prétention d'apporter une méthode d'essai parfaite. Nous avons simplement cherché à mettre au point une méthode plus exacte que celles qui existent déjà, méthode que des travaux ultérieurs pourront, nous l'espérons, améliorer encore.

Dans le présent travail, nous examinerons successivement :

Dans le premier chapitre. — Les diverses méthodes proposées pour l'essai *in vitro* des substances chimiques antimicrobiennes. Nous les discuterons brièvement.

Dans le deuxième chapitre. — Insistant sur la nécessité de travailler

sur des bases plus précises, nous chercherons les moyens d'établir une méthode valable, en examinant successivement les divers facteurs qui peuvent modifier l'activité germicide.

Nous donnerons à ce sujet les résultats trouvés par les autres auteurs, et ceux de nos propres essais.

Dans le troisième chapitre. — Nous donnerons les deux techniques que nous avons mises au point, toutes deux construites sur les bases précédentes.

La première technique, d'exécution facile, rapide, donnant des résultats très réguliers, mais semblant sujette à objection pour l'étude de certains groupes de substances antiseptiques.

La deuxième, d'exécution beaucoup plus difficile et plus longue, donnant, en raison de sa complexité, des résultats peut-être moins réguliers, mais pouvant s'appliquer indifféremment à tous les groupes de substances chimiques antimicrobiennes.

Nous sommes heureuse de pouvoir remercier ici M. RADAIS qui, en nous accueillant comme monitrice, puis comme assistante aux travaux pratiques de bactériologie, nous a permis de poursuivre nos études vers la recherche.

Nous remercions également M. DEVAL pour la bienveillance dont il a toujours fait preuve à notre égard.

Nous ne voulons pas oublier nos maîtres de l'École de Médecine et de Pharmacie de Nantes, qui nous ont donné nos premiers enseignements, et qui ont toujours manifesté à notre égard un bienveillant intérêt.

Nous ne saurons jamais assez remercier M. RÉGNIER pour tout ce que nous lui devons. Depuis huit années que nous travaillons à ses côtés, à l'hôpital Ambroise-Paré, aussi bien pendant qu'après notre temps d'internat, il n'a cessé de nous guider et de nous aider de toutes façons. C'est près de lui que nous avons appris à aimer la recherche et c'est grâce à lui que nous avons pu entreprendre ce travail et le mener à bonne fin. Nous sommes particulièrement heureuse de pouvoir, ici, lui exprimer notre très grande reconnaissance pour le précieux appui que nous a sans cesse apporté sa science, jointe à sa conscience et à son inlassable sollicitude.

Que MM. les Professeurs de la Faculté des Sciences MM. PORTIER, GUILLIERMOND et JAVILLIER, qui nous ont fait le grand honneur de faire partie du jury de cette thèse, veuillent bien trouver ici l'expression de nos respectueux remerciements.

CHAPITRE PREMIER

MÉTHODES JUSQU'ICI PROPOSÉES POUR L'ESSAI « IN VITRO » DES SUBSTANCES ANTIMICROBIENNES

NOTIONS GÉNÉRALES SUR LA MESURE DU POUVOIR ANTIMICROBIEN

Avant d'exposer dans leur détail les méthodes jusqu'ici proposées pour l'essai des substances antimicrobiennes, il nous paraît indispensable de rappeler quelques notions d'ordre général.

Dans le langage courant, on emploie généralement deux termes pour désigner la lutte contre les microbes. On parle de « désinfection » et « d'antisepsie ». La première de ces actions est considérée généralement comme la destruction des germes qui se trouvent dans le milieu extérieur à l'organisme vivant. La seconde de ces actions semble être moins bien définie : Pour la majorité des auteurs, l'antisepsie s'adresserait uniquement aux germes parasitant l'organisme vivant ; aussi, devant éviter de léser l'organisme parasité, se bornerait-elle à empêcher la prolifération des germes. La désinfection, s'adressant, au contraire, à des corps inertes, chercherait non seulement à atteindre cette action inhibitrice, mais encore à assurer une complète destruction des germes présents.

On attribue donc aux deux termes « désinfection » et « antisepsie » des sens différents. Ces conceptions ont été étendues également, et

peut-être avec moins de raisons, aux substances utilisées pour exercer ces actions. Ainsi, l'antiseptique est-il souvent considéré comme une substance destinée à empêcher la prolifération des germes dans l'organisme vivant, alors que le désinfectant est plutôt considéré comme une substance destinée à détruire définitivement les germes partout où ils se trouvent extérieurement à cet organisme.

En ce qui concerne nos travaux, dont le but, tout préliminaire, ne peut pas préjuger de l'application ultérieure des corps étudiés, nous emploierons, selon l'usage habituel, indifféremment, les termes « antiseptique » et « désinfectant » pour désigner les agents capables d'exercer l'action antimicrobienne en général. Cependant, comme il existe indéniablement, dans cette action antimicrobienne, des degrés divers, nous allons donner des définitions plus précises. Nous emploierons, dans ce but, des termes qui pourront paraître inaccoutumés, mais qui auront le mérite de ne prêter à aucune confusion.

Dans l'étude de l'action antimicrobienne nous apparaissent, dès l'abord, deux processus : le premier se traduit par un arrêt de la multiplication des germes, sans qu'il s'ensuive nécessairement une destruction définitive. Nous dirons, pour exprimer cette première phase de l'action antimicrobienne, qu'il y a mise en jeu de la propriété inhibitrice infertilisante, ou, plus spécialement, *antigénétique*.

Le deuxième processus, qui se produit par emploi de doses de substances plus fortes, se traduit par la *destruction définitive* de l'agent pathogène. Nous désignerons cette propriété microbicide, ou germicide, plus particulièrement sous le nom de « propriété *antibiotique* ».

Nous donnerons donc pour les termes « pouvoir antigénétique » et « pouvoir antibiotique », qui nous serviront à caractériser les valeurs antimicrobiennes des substances chimiques, les définitions suivantes :

Pouvoir antigénétique. — C'est la faculté que possède une substance de *suspendre temporairement la vie des microbes*, ou de *s'opposer à leur développement*, dans un milieu où se trouvent réalisées les conditions optima.

Nous le représenterons par la dose de substance qu'il suffit d'ajouter à un litre de bouillon de culture pour y empêcher le développement d'une quantité connue de germes dans des conditions favorables déterminées.

Pouvoir antibiotique. — C'est la faculté que possède une substance de *détruire définitivement les germes* dans un milieu donné, de telle sorte qu'ils ne puissent plus se développer ultérieurement dans un milieu où se trouvent réalisées les conditions optima.

Nous le représenterons par la dose du produit qu'il suffit d'ajouter à un litre d'un milieu déterminé pour tuer, en un temps donné, une quantité connue de germes.

Il est extrêmement difficile d'établir une classification nettement tranchée des diverses méthodes jusqu'ici proposées pour mesurer les activités antimicrobiennes. Peu d'entre elles, en effet, se rallient à un type défini. Cependant, si l'on veut exposer ces méthodes sans en donner

une simple liste chronologique, par trop fastidieuse, il faut tenter de rapprocher celles qui ont été inspirées par une même idée.

A ce point de vue, nous pouvons distinguer deux grands groupes :

a) Les méthodes établies dans un but pratique, qui cherchent à déterminer les doses des substances à mettre en œuvre, soit pour arrêter le développement des germes (doses antigénétiques), soit pour les détruire définitivement (doses antibiotiques).

Ces méthodes se bornent donc à *constater la phase terminale de l'action désinfectante*.

Ce sont les méthodes proprement dites d'essai des substances antimicrobiennes.

b) Les méthodes de portée plus théorique, nées de la conception que la désinfection n'est que l'aboutissement d'une action progressive, qui cherchent à *suivre l'évolution* de l'action antimicrobienne.

Certaines d'entre elles s'attachent spécialement à étudier l'évolution du phénomène *dans le temps*. Elles cherchent à connaître le nombre des germes qui survivent à l'action, durant des temps variables, de ces substances antimicrobiennes.

D'autres, au contraire, suivent l'évolution du phénomène *dans son intensité*. Elles étudient l'action de doses variables d'antiseptiques, depuis les très faibles doses, à peine capables de gêner la poussée, jusqu'aux doses qui suffisent à réaliser la désinfection. Ces méthodes cherchent à traduire l'action désinfectante par des courbes et des formules mathématiques.

Comme nous le verrons plus loin, ces méthodes sont encore à l'étude. Elles apparaissent, pour l'instant, trop complexes pour posséder une valeur vraiment pratique.

Nous étudierons plus particulièrement les premières méthodes, celles qui se bornent à constater la phase terminale de l'action désinfectante.

Ces méthodes peuvent elles-mêmes être divisées en deux grands groupes, selon qu'elles recherchent *les plus petites doses de substances, capables d'inhiber le développement des germes (doses antigénétiques)*, ou qu'elles recherchent les plus petites doses de substances capables *de tuer les germes définitivement (doses antibiotiques)*.

Nous aurons donc à examiner successivement :

1^o Les méthodes de détermination de la *valeur antigénétique* des substances antimicrobiennes ;

2^o Les méthodes de détermination de leur *valeur antibiotique*.

Voyons, de façon plus précise, en quoi consistent ces deux déterminations :

La mesure de la valeur antigénétique est la plus simple. Elle consiste à déterminer la quantité de substance à introduire dans un milieu de culture pour *empêcher le développement des germes* qui s'y trouvent ou que l'on y ajoute.

Dans sa détermination, deux facteurs sont donc à considérer : — 1^o les microbes et — 2^o la substance antimicrobienne. Quant au milieu où

s'effectue leur contact c'est toujours un milieu optimum pour la croissance des germes.

La mesure de la *valeur antibiotique* est moins simple. Elle consiste à déterminer la plus faible quantité de substance *capable de tuer*, en un temps donné, des germes placés dans un milieu variable. Pour vérifier le résultat de cette action, il faut donc transporter les germes traités par la substance chimique dans un milieu de culture propre à leur développement éventuel (milieu de subculture).

Dans cette détermination, nous avons donc à considérer :

a) L'action antimicrobienne elle-même, avec ses trois facteurs essentiels :

1^o Les microbes ; — 2^o La substance chimique ; — 3^o Le milieu intramédiaire où s'effectue le contact.

b) La vérification de cette action, par le non-développement des germes dans un milieu de subculture.

Il y a lieu, par ailleurs, de tenir compte, également, des conditions extérieures de l'essai, susceptibles d'influencer fortement les résultats.

I

MÉTHODES DE DÉTERMINATION DE LA VALEUR ANTIGÉNÉTIQUE D'UNE SUBSTANCE CHIMIQUE

Nous trouvons de très bonne heure, dans la littérature, des essais effectués en vue de *déterminer quelle quantité d'une substance chimique il faut ajouter à un milieu de culture pour y empêcher le développement des germes*.

Avant même la découverte des microbes, certains auteurs avaient essayé de déterminer les quantités de diverses substances chimiques capables d'arrêter les fermentations, ou d'empêcher la putréfaction des milieux organiques.

Dès 1750, Pringle ⁽²³²⁾ classait les « médicaments antiputrides » en mélangeant à certaines substances putrescibles des liquides médicamenteux, et en cherchant lesquels retardaient ou empêchaient la putréfaction.

En 1769, Angus Smith ⁽²⁷⁹⁾ étudiait l'action protectrice des substances gazeuses ou volatiles sur la putréfaction, en suspendant des morceaux de viande aux bouchons de flacons contenant ces substances.

O'Nial ⁽²⁰³⁾ eut, le premier, en 1872, l'idée de noter le moment d'apparition des micro-organismes dans des liquides putrescibles (« infusion de bœuf ») additionnés de divers antiseptiques.

Trois années plus tard, Baxter ⁽⁹⁾ étudia l'action de divers désinfectants sur des cultures microbiennes impures, et nota l'influence sur cette action de la constitution chimique des milieux environnants.

Citons encore, à la même époque, Davaine (1875) ⁽⁷⁰⁾, puis, en 1879, Büchholtz, Kühn, Haberkorn ⁽³⁸⁾, qui faisaient agir les antiseptiques sur des liquides chargés de microbes (infusions de feuilles de tabac, de seigle ergoté ; liquides albumineux, urine vieillie), et mettaient en évidence la résistance très variable des germes pour un même antiseptique, selon la composition du milieu de culture.

De leur côté, Gosselin et Bergeron (1879) ⁽¹¹⁶⁾ ajoutaient diverses quantités de solutions antiseptiques à des tubes de sang frais ou de sérum, et notaient pour chacun la date du début de la putréfaction.

Jalan de la Croix ⁽¹⁵²⁾ reprenait, en 1881, les expériences de Büchholtz,

Kühn et Haberkorn, et publiait une série de travaux relatifs aux variations de résistance des bactéries selon le milieu de culture. Ses travaux furent d'ailleurs vivement critiqués, deux années plus tard, par Duclaux (1883) ⁽⁸¹⁾, qui montra la nécessité de signaler, à côté de la dose active d'un antiseptique, les diverses conditions de l'essai.

Marcus et Pinet ⁽¹⁹¹⁾ indiquèrent, en 1882, les quantités de différents antiseptiques qui s'opposaient au développement des bactéries de la putréfaction.

Enfin, en 1883, le Français Miquel ⁽¹⁹⁵⁾ publia un ensemble de travaux dans lesquels se trouvait indiquée « la quantité de substance antiseptique nécessaire pour empêcher la putréfaction d'un litre de bouillon de bœuf neutralisé, puis exposé aux germes de l'air ». Ces tableaux bien connus figurent encore dans la plupart des traités classiques français. Miquel fut l'un des premiers à insister sur le mode d'action des antiseptiques et à distinguer la dose qui tue les germes de la dose « infertilisante » qui suspend seulement les manifestations de la vie microbienne.

La plupart des auteurs cités utilisaient, comme milieu d'action, des matières en putréfaction ou des milieux de culture impurs, de constitution inconnue, tenant en suspension des quantités variables de germes divers. Dans les travaux suivants, nous allons trouver quelques progrès dans la détermination de la valeur antigénétique.

En 1906, Bechhold et Ehrlich ⁽¹²⁾ recherchèrent le « pouvoir inhibiteur » des substances chimiques de la façon suivante : « 2 centimètres cubes de bouillon étaient placés avec des quantités décroissantes de l'antiseptique, et le tout complété à 4 centimètres cubes avec de l'eau physiologique stérile. On ajoutait trois gouttes d'une culture microbienne de quarante-huit heures et plaçait à l'étuve. » Après vingt-quatre à quarante-huit heures, on observait les résultats, et vérifiait par un examen microscopique les observations faites à l'œil nu.

En 1908, Guéguen ⁽¹²⁰⁾, en France, détermina la valeur antigénétique d'une substance en la mélangeant à du bouillon gélatiné et en ensemençant la surface de ce milieu refroidi à l'aide d'une goutte de culture microbienne. Les tubes ainsi préparés étaient placés à 22° et observés journellement. Les résultats étaient notés toutes les vingt-quatre heures, durant une dizaine de jours. Lorsqu'ils étaient stationnaires, on calculait, d'après la dose d'antiseptique contenue dans le premier tube resté stérile, le pouvoir inhibiteur de la substance.

La même année, Schneider et Seligmann ⁽²⁶⁸⁾ notèrent la grande importance des propriétés antigénétiques d'une substance pour la détermination de sa valeur antibiotique.

Étudiant particulièrement les désinfectants du groupe du phénol et du formol, ils décrivirent la technique suivante pour la détermination de l'activité antigénétique de ces corps :

« Des tubes à essais, contenant 10 centimètres cubes de bouillon, étaient ensemencés chacun avec une anse de culture de staphylocoques, âgée de vingt-quatre heures, en bouillon. Un tube servait de témoin. Dans les autres tubes, on introduisait l'antiseptique à des concentrations déterminées, à raison d'une anse (soit 0^{cc},033) de solutions de titres variables, pour 10 centimètres cubes de bouillon. » Les tubes

étaient placés aussitôt à l'étuve à 37° C. et, après vingt-quatre heures, on examinait s'il s'était produit une poussée.

Les auteurs considéraient qu'une différence nette de poussée entre les tubes additionnés d'antiseptique et le témoin suffisait à mettre en évidence l'arrêt du développement des germes, produit par la substance antiseptique. Ils jugeaient donc inutile de poursuivre plus longtemps l'observation.

Schneider et Seligmann purent ainsi mettre en évidence l'action fortement antigénétique de certains crésols. Ceci avait, comme nous le verrons plus tard, une grande importance pour la détermination de l'action antibiotique de ces substances.

En 1918, Eisenberg ⁽⁹⁰⁾, étudiant les propriétés antigénétiques de diverses matières colorantes, rejeta, pour cet essai, l'emploi du bouillon qui donnait trop souvent, avec ces corps, des précipités rendant impossible l'observation directe de la poussée. Les colorants étaient ajoutés à de la gélose liquéfiée ; celle-ci, disposée en tubes inclinés, ou en plaques, était ensuite ensemencée à l'aide d'une jeune culture microbienne en bouillon. Les tubes étaient placés durant deux jours à l'étuve à 37° C., puis conservés quelques jours à la température ambiante, afin d'observer une poussée éventuelle.

En 1920, Churchmann ⁽⁵²⁾, recherchant l'activité antigénétique du violet de gentiane, insista sur l'importance générale de cette propriété. Il nota qu'elle était tout aussi importante que l'activité antibiotique, et que, par conséquent, il était tout à fait erroné de chercher la valeur d'une substance antimicrobienne par la seule détermination de son coefficient phénol.

En 1922, dans une étude relative à l'influence de la réaction du milieu sur l'arrêt du développement des germes, l'auteur décrivit la technique suivante :

A des tubes de bouillon de 5 centimètres cubes, on enlève 0^{cc},5 de milieu nutritif que l'on remplace par 0^{cc},5 d'antiseptique dilué. On ensemence ce bouillon avec 1/200 d'anse d'une culture microbienne, et l'on observe après avoir laissé ces tubes à l'étuve, pendant huit jours.

On calcule la valeur antigénétique de la substance d'après la plus faible concentration qui arrête la croissance des germes dans ces conditions.

En 1926, Delcourt-Bernard ⁽⁷⁴⁾, notant que l'essai d'une substance antiseptique devait comporter celui de son « pouvoir inhibitif » et celui de son « pouvoir microbicide », décrivit pour le premier la technique suivante :

On incorpore aseptiquement, dans du bouillon de culture, chaque solution à étudier, puis on ensemence les tubes avec des cultures de vingt-quatre heures de différents germes. Après un séjour de vingt-quatre à quarante-huit heures à 37° C., on note les résultats.

Plus récemment (1928-1930), Morel et Rochaix ⁽¹⁹⁹⁾, étudiant le « pouvoir infertilisant de quelques essences végétales », employèrent la technique suivante :

« Les essences furent dissoutes dans l'alcool à 60 p. 100, de façon à

pouvoir être introduites et réparties d'une manière homogène dans des tubes de gélose stérilisée, préalablement liquéfiée. Chacun de ces tubes disposés en séries recevait en volume la dose voulue d'essence à étudier. Les tubes étaient ensuite basculés dans des boîtes de Pétri qu'on abandonnait à la température du laboratoire, jusqu'à solidification.

Lorsque le milieu était solidifié, il recevait quelques gouttes de culture de vingt-quatre heures en eau peptonée de bacille d'Eberth ou de staphylocoque, gouttes que l'on étalait à la surface du milieu, au moyen d'un agitateur coudé stérilisé. Les boîtes de Pétri étaient portées à l'étuve à 37° C., et observées journallement pendant huit jours.

Les auteurs établirent ainsi les « doses minima nécessaires » pour empêcher l'apparition des cultures microbiennes.

Süpfle et Hofmann (²⁸⁹), en 1930, essayèrent la valeur antigénétique de préparations argentiques, en opérant d'une part en bouillon, et, d'autre part, en milieu gélosé qu'ils additionnaient d'antiseptique, puis ensemençaient en surface.

Enfin, tout récemment, Georges Léonard (¹⁷⁷) a exposé à son tour les difficultés rencontrées dans la détermination de la valeur antibiotique de certains composés fortement antigénétiques. Il a noté qu'il était parfois impossible d'éliminer cette action antigénétique lorsqu'on utilisait les techniques habituelles que nous étudierons plus loin. Afin de se rendre compte de la grandeur de cette action antigénétique, il décrivit un procédé de détermination, qu'il désigna sous le nom de *Antiseptic or growth restraining test*, ou « G. R. Test ». Cet essai était effectué en milieu liquide, c'est-à-dire par addition de l'antiseptique à du bouillon de culture ensemencé. Mais, comme beaucoup des préparations essayées par l'auteur troublaient le bouillon, il devenait très difficile de distinguer, par observation directe, s'il y avait ou non développement des germes. Aussi, l'auteur remplaçait-il le bouillon ordinaire par du bouillon dextrosé (1 p. 400) additionné d'un colorant. Ce milieu virait du rose au rouge sous l'influence de la fermentation du dextrose, produite par le bacille typhique et par le staphylocoque, les deux germes de l'essai. La poussée de ces germes se manifestait donc, d'une façon évidente, par le changement de coloration du milieu.

La technique de l'essai est la suivante :

Des dilutions antiseptiques à concentration double de celle nécessaire à l'essai sont préparées et ajoutées à un égal volume (5 centimètres cubes) du bouillon ci-dessus.

A chaque tube, on ajoute 0^{cc},1 d'une culture de 24 heures, en bouillon, de bacille typhique ou de staphylocoque, et on mélange soigneusement le contenu de chaque tube. On met à incuber 4 jours, au moins, à 37° C.

L'auteur reconnaît que cet essai n'est pas d'une précision absolue, mais il pense que ce procédé permet de distinguer très nettement les substances fortement et faiblement antigénétiques.

Enfin Allen et Wright (²) (1931) ont insisté sur l'impossibilité d'utiliser les anciennes méthodes de standardisation des substances antimicrobiennes pour l'essai des corps nouveaux. Ils ont donc proposé des

essais plus complets, comme nous le verrons à propos des méthodes de détermination des valeurs antibiotiques. Ils ont décrit une méthode qui est, avec quelques modifications, celle établie, en 1924, par Himebaugh ⁽¹⁴¹⁾, et désignée sous le nom de *Agar cup plaque method*. Cette technique permet de déterminer à la fois la valeur antigénétique de la substance et sa valeur antibiotique. Nous en décrirons ici la première phase qui a trait à la détermination de la valeur antigénétique :

Dans le but de préparer, autant que possible, au laboratoire, des liquides colloïdaux semblables à ceux de l'organisme et des tissus, on choisit une gélose standard à l'extrait de bœuf, contenant de 10 à 50 p. 100 de sérum sanguin normal. L'organisme choisi pour l'essai est le staphylocoque.

La technique de l'essai est la suivante :

La gélose standard, liquéfiée et suffisamment refroidie, est additionnée de 10 p. 100 de sérum sanguin. Les fioles contenant ce milieu sont immédiatement ensemencées avec une culture en bouillon de 24 heures, de staphylocoque. L'ensemencement se fait en diluant la culture au 1/20 000, puis en ajoutant 1 centimètre cube de cette dilution aux fioles de bouillon (250 centimètres cubes). Après avoir ensemencé et mélangé soigneusement, on transporte, dans des boîtes de Pétri, 30 centimètres cubes du milieu ensemencé, et, après refroidissement, on enlève, au centre des plaques, des disques de gélose d'un diamètre de 2 centimètres. On coule alors quelques gouttes de gélose liquéfiée au centre de cette dépression, afin de former, au centre de la plaque, une petite cupule de gélose dans laquelle on placera l'antiseptique à essayer (0^{cc},5 de solution de l'antiseptique). Si, pratiquement, ce corps doit rester longtemps au contact des germes, on le laisse dans la cupule durant 48 heures. S'il est destiné à agir rapidement, on l'enlève à l'aide d'un papier filtre stérile, au bout de 5, 10, 15 ou 20 minutes. Les boîtes de Pétri sont ensuite placées 48 heures à l'étuve à 37° C., afin d'assurer la croissance de tous les germes non arrêtés dans leur développement.

Un autre essai, effectué par repiquage, permet de déterminer la valeur antibiotique du produit.

Aux auteurs qui ont cherché à mettre en évidence la poussée des microbes ensemencés sur milieux nutritifs solidifiés [Guéguen ⁽¹²²⁾, Rochaix ⁽²⁵⁸⁾, etc...], nous pouvons en adjoindre certains autres qui ont, comme nous le verrons plus loin, cherché à apprécier en même temps le pouvoir de diffusion des substances étudiées [Carnot et Dumont ⁽⁴⁴⁾ (1918), Kendall et Edwards ⁽¹⁵⁵⁾ (1921), Reddish ⁽²³⁷⁾ (1928), Wright ⁽³¹¹⁾ (1924)]. Il nous a semblé intéressant de classer à part ces techniques. Nous ne les considérons du reste pas comme supérieures aux autres. A notre avis, en effet, et comme nous le verrons plus loin, seul un milieu liquide peut assurer parfaitement le contact indispensable entre le désinfectant et les germes.

Les techniques de mesure du pouvoir antigénétique, que nous venons de citer, ont été choisies à titre d'exemples, afin de montrer que, à part quelques différences de détail, elles reposent toutes sur une même base. La seule différence importante qui les sépare consiste en ce que l'essai est parfois effectué en milieu liquide et parfois en milieu solide. Nous allons voir maintenant que les diverses méthodes proposées pour l'essai du pouvoir antibiotique offrent une bien plus grande complexité.

II

DÉTERMINATION DE LA VALEUR ANTIBIOTIQUE D'UNE SUBSTANCE CHIMIQUE

VUE GÉNÉRALE

Comme nous l'avons indiqué précédemment, la détermination de la valeur antibiotique d'une substance chimique consiste à *chercher la plus petite dose de cette substance capable de détruire définitivement des germes, de telle sorte qu'ils ne puissent plus se développer ultérieurement sur un milieu de culture favorable.*

Cet essai comporte donc deux phases nettes :

1° L'action désinfectante elle-même, c'est-à-dire le contact entre la substance et les germes ;

2° La vérification du résultat de cette action, par ensemencement des germes traités dans un milieu de culture favorable (subculture).

Dans la première de ces phases, nous avons, comme dans toute réaction de désinfection, trois termes en présence : a) *Les microbes* ; — b) *La substance désinfectante* ; — c) *Le milieu intermédiaire où s'effectue leur contact.*

Ces trois termes doivent être nettement fixés pour l'essai. Nous allons voir qu'ils peuvent l'être différemment, et ceci nous entraînera à distinguer plusieurs groupes parmi les méthodes de détermination des valeurs antibiotiques.

La première idée, la plus simple qui se présenta à l'esprit, fut de faire agir le désinfectant dans un milieu liquide où se trouvaient en suspension les germes à atteindre, puis de reporter, après un certain temps, une fraction de cette émulsion microbienne dans des milieux de subculture. Mais cette idée, très simple en théorie, se heurta très vite à une grave difficulté pratique : une certaine quantité de substance désinfectante

était transportée, en même temps que les germes, dans la subculture, et gênait leur développement. C'était donc ainsi l'action antigénétique de la substance qui intervenait, et risquait de faire considérer comme morts des germes qui se trouvaient seulement entravés dans leur développement.

Aussi cette technique fut-elle, assez vite, laissée de côté et remplacée généralement par une autre méthode permettant d'éviter le transport du désinfectant dans la subculture. Les microbes, au lieu d'être maintenus en suspension dans un liquide, étaient placés sur des objets inertes, dits « porte-germes », traités par la solution antiseptique, puis débarrassés, par des procédés divers, de toute trace d'antiseptique, avant d'être repiqués dans le milieu de subculture. Ce deuxième thème de travail donna, très rapidement, naissance à des méthodes précises de mesure des pouvoirs antibiotiques, techniques connues sous le nom de *méthodes des porte-germes*.

La première idée, abandonnée un peu prématurément, ne fut vraiment reprise qu'au début du siècle. Elle donna naissance aux *méthodes dites « des suspensions »*.

Ces deux groupes de méthodes d'essai, méthodes des « porte-germes » et méthodes des « suspensions », comprennent les techniques les plus répandues. C'est, notamment, aux méthodes des suspensions qu'appartiennent les méthodes, officielles en Angleterre et en Amérique, des « coefficients phénol ». Nous pourrions donc, dans le travail présent, nous contenter d'exposer ces deux groupes principaux de méthodes. Il nous paraît, cependant, utile de citer d'autres méthodes moins importantes, basées sur d'autres idées. Ainsi, certains bactériologistes renoncèrent à faire agir les désinfectants sur des germes développés dans des milieux liquides. Ils utilisèrent des germes développés sur des milieux solides. D'autres auteurs, cherchant, comme nous l'avons déjà dit, le pouvoir de diffusion des substances, ensemençaient les germes sur des milieux de culture solidifiés préalablement additionnés de l'antiseptique étudié.

Bien que les idées qui ont guidé ces derniers auteurs dans l'établissement de leurs méthodes soient très dissemblables, nous grouperons ces diverses techniques en un seul groupe. Ces techniques s'adressent, en effet, toutes à des germes développés sur milieux solidifiés.

En résumé, nous aurons donc successivement à examiner, dans le groupe des méthodes d'essai, des valeurs antibiotiques :

a) *Les méthodes des « porte-germes »*, dans lesquelles les germes *sont fixés sur des objets inertes, puis immergés dans une solution antiseptique* :

b) *Les méthodes des « suspensions »*, dans lesquelles les germes *sont en suspension dans un liquide additionné d'antiseptique* :

c) *Des méthodes*, dans lesquelles les germes à l'essai *sont ensemencés sur un milieu nutritif solidifié*, l'antiseptique étant placé, soit directement au contact des germes qui se sont développés, soit introduit, préalablement au développement des germes, dans le milieu de culture.

A. — MÉTHODES DES PORTE-GERMES

Ces méthodes consistent, comme nous l'avons dit précédemment, à immerger, dans des solutions de substances antimicrobiennes, des objets inertes sur lesquels sont fixés les germes à détruire. Après un temps connu, ces objets sont retirés de la solution désinfectante, puis subissent un traitement approprié, afin d'être débarrassés du désinfectant qu'ils ont pu entraîner. Enfin, on transporte ces porte-germes dans un milieu de culture favorable (subculture), afin d'assurer le développement des germes non détruits.

Les objets inertes servant au transport des germes sont appelés « porte-germes », d'où le nom servant à désigner les techniques basées sur leur emploi. Ces « porte-germes » peuvent être de nature diverse (fils de soie, morceaux de batiste, billes de verre, etc...), ce qui entraîne divers types de ces méthodes, dont nous décrivons ici les principaux.

Robert Koch (¹⁶⁰), le premier, en 1881, en réalisant l'obtention des milieux solides, et, par suite, la purification possible des cultures, put donner un procédé précis de détermination des valeurs antimicrobiennes. C'est à lui que l'on doit le premier des procédés des « porte-germes », connu sous le nom de « Méthode des fils ».

I. — Méthode des fils de Robert Koch.

Cette méthode, qui a été très employée, est, maintenant, presque complètement abandonnée. Aussi nous contenterons-nous d'en donner le principe :

Des fils de soie, longs de 1 centimètre, sont imprégnés de suspensions de différents germes (Bacilles du charbon, sporulés ou non, *B. prodigiosus*, *B. pyocyanique*). Ces fils, chargés de germes, sont alors desséchés, puis soumis, durant un certain temps, à l'action de solutions à diverses concentrations du désinfectant. Le désinfectant adhérent aux fils ayant été, autant que possible, éliminé par lavage, les fils sont disposés séparément à la surface d'un milieu de culture solide (bouillon gélatiné). Le tout est mis à incuber, et l'on note la concentration minima du désinfectant pour laquelle la culture n'a pas lieu.

Cette méthode, simple en apparence, ne tarda pas à se montrer défectueuse, au moins en certains points. Le reproche le plus important que l'on pouvait lui faire, était le suivant : Malgré le lavage qui suivait l'immersion des fils dans la culture bactérienne, des traces de désinfectant pouvaient être transportées dans la subculture. Ces traces étaient d'autant plus gênantes que les milieux solides utilisés pour la subculture n'en permettaient aucune dilution. Le désinfectant entraîné restait donc au contact direct des germes, risquant ainsi d'entraver leur multiplica-

tion. Aussi, certains auteurs, dont Woodhead, en 1887, proposèrent-ils de remplacer les milieux de subculture solides par des milieux liquides, dans lesquels pouvaient s'effectuer une dispersion et une dilution immédiate du désinfectant entraîné. Cependant, dans les deux années qui suivirent, Geppert ⁽¹¹³⁾, puis Fraenkel ⁽¹⁰⁴⁾ et Behring ⁽¹⁷⁾ constatèrent que des lavages, même répétés, n'arrivaient pas à enlever complètement l'antiseptique retenu par les fils.

Par ailleurs, il était extrêmement difficile d'obtenir un ensemencement uniforme à la surface des fils.

Enfin, au cours de la manipulation bactériologique, il pouvait se produire sur les fils des précipitations ou des dessiccations de matières colloïdales provenant des milieux de culture, dont la présence pouvait exercer ultérieurement une action protectrice sur les bactéries.

Toutes ces raisons firent bientôt abandonner les fils comme porte-germes, et utiliser à leur place des morceaux de verre sans rugosités, billes de verre, ou « grenats de Bohême ».

Ainsi prit naissance le procédé des porte-germes qui succéda à celui de R. Koch, procédé encore employé aujourd'hui. Nous exposerons en détail la technique mise au point par Paul et Krönig ⁽¹⁶⁴⁾ (1897), revue par Paul ⁽²¹⁷⁾ en 1901, connue sous le nom de « Méthode des grenats ». Cette technique fut améliorée par Laubenheimer ⁽¹⁷³⁾ en 1909, puis de nouveau par Paul, Birstein et Reuss en 1910 ⁽²¹⁸⁾.

II. — Méthode des « grenats » de Paul et Krönig.

A. PRÉPARATION DES PORTE-GERMES. — Des « grenats » de Bohême, simples billes de verre de Bohême, sont triées au tamis. On ne prend que ceux dont le diamètre est de 1^m^m,5 à 2 millimètres. Ils sont soigneusement nettoyés, par trois ébullitions successives, dans un acide dilué et lavage prolongé à l'eau, puis à l'eau distillée. Après lavage à l'alcool absolu, à l'éther, de nouveau à l'alcool absolu et enfin à l'eau distillée, ils sont desséchés, puis stérilisés dans une étuve à air chaud. Ils peuvent alors être utilisés pour l'essai.

B. PRÉPARATION DE L'ÉMULSION MICROBIENNE. — On utilise comme matériel d'épreuve :

1° Comme cultures sporulées, du *B. anthracis*, isolé, quelques instants après la mort, d'une souris infectée, et laissé 3 jours à 37° pour assurer la sporulation ;

2° Comme forme végétative, du *Staphylococcus aureus*, en cultures ayant séjourné 48 heures à l'étuve à 37°.

L'émulsion microbienne est préparée en émulsionnant chaque culture sur gélose inclinée dans 16 centimètres cubes de solution physiologique (NaCl). Cette émulsion est passée sur un double filtre plissé stérile, afin d'éliminer les plus grosses particules en suspension.

C. DESSICCATION DES MICROBES SUR LES PORTE-GERMES. — La suspension microbienne (16 centimètres cubes) est introduite, avec les grenats préparés et stérilisés (20 grs), dans une petite fiole d'Erlenmeyer. Le tout ayant été soigneusement agité, le liquide en excès est décanté et les grenats sont portés dans un entonnoir dont la douille est garnie d'un tampon de coton. Ils y sont laissés jusqu'à égouttement complet. La dessiccation des grenats chargés de l'émulsion bactérienne se fait alors dans une « boîte à dessiccation » spéciale (petite boîte rectangulaire garnie d'un filet nickelé destiné à recevoir les grenats.

Cette boîte est elle-même placée dans un récipient en zinc, muni d'un couvercle et dont le fond est garni de chlorure de calcium granulé desséché). Durant cette opération qui demande au moins 12 heures, la boîte est placée à la glacière.

D. MARCHE DE L'ESSAI. — Les solutions antiseptiques sont placées, à raison de 20 centimètres cubes, dans de petits récipients de verre munis d'un couvercle. On met ceux-ci dans un thermostat auquel on assure, grâce à un système d'agitation, une température uniforme de 18° C. Lorsque la solution désinfectante a atteint 18° (au bout d'une demi-heure environ), les grenats sont prélevés un à un à l'aide d'une pince de platine flambée, et portés sur un petit crible de platine qui permet de les plonger tous en même temps dans la solution antiseptique.

Après un temps déterminé, le crible de platine est retiré de la solution antiseptique et porté dans un petit récipient contenant de l'eau stérile. La majeure partie de l'antiseptique entraîné est ainsi éliminée.

On procède alors à un deuxième lavage dans un réactif propre à neutraliser chimiquement le désinfectant présent. Enfin, un troisième lavage de 10 minutes dans l'eau distillée doit éliminer le corps chimique utilisé pour la neutralisation. (Laubenheimer ⁽¹⁷³⁾ a proposé de remplacer par trois lavages successifs à l'eau la neutralisation chimique du désinfectant.)

Les grenats sont alors transportés, par 5, à l'aide d'une pince stérile, dans des tubes à essais gradués contenant 3 centimètres cubes d'eau stérile. On agite vigoureusement les tubes, afin de mettre en suspension dans l'eau les germes fixés sur les grenats.

Afin de déterminer la quantité des germes survivants, on mélange cette suspension avec du bouillon gélosé à 2 p. 100, liquéfié et refroidi à 42° C. Le mélange est effectué à l'anse de platine, puis coulé en boîtes de Pétri. Enfin, après une incubation de trois jours, on compte le nombre des colonies développées, et on prend comme résultat la moyenne des chiffres obtenus au cours de plusieurs essais.

Notons que, dès cette époque, Paul et Krönig constatèrent l'influence qu'exerce sur les résultats de l'essai la résistance des bactéries utilisées. Ils proposèrent donc de déterminer celle-ci avant chaque essai. Pour cela, ils cherchèrent combien de ces bactéries restaient vivantes après action, durant un certain temps, d'une solution de sublimé de concentration déterminée. Les auteurs appliquèrent particulièrement leur technique à l'étude du processus de destruction des bactéries au cours de la désinfection. Ils furent parmi les premiers à voir que la valeur relative des désinfectants dépendait des conditions de l'essai, et ils montrèrent la nécessité d'observer certaines règles dans tout essai comparatif de désinfectants. Enfin, Paul, en 1901, proposa d'adopter les spores de charbon et le sublimé comme organisme et désinfectant standards.

La méthode que nous venons d'exposer, et qui fut décrite en détail par ses auteurs, présente sur la méthode des fils de Koch des avantages certains. Elle permet, par exemple, une élimination relative du désinfectant entraîné par les porte-germes. Mais, pas plus que la méthode des fils et, d'ailleurs, que toutes les méthodes semblables, quel que soit le support choisi pour les germes, cette méthode des grenats n'est utilisable avec toutes les espèces bactériennes. Elle ne peut, en effet, s'appliquer qu'à l'essai des bactéries résistantes ou sporulées, qui conservent,

après dessiccation, une résistance suffisante, et il ne saurait être question de l'utiliser dans le cas de germes peu résistants qui, après un traitement tel qu'une dessiccation de douze heures, même à la glacière, doivent être extrêmement affaiblis.

Un exemple frappant de l'impossibilité d'employer ces techniques des « porte-germes », sur des germes non sporulés, est donné par Bechold et Ehrlich ⁽¹²⁾ qui, avec la méthode des fils, obtinrent la destruction de bacilles diphtériques desséchés en un temps très court (1 minute), alors qu'il fallait un temps beaucoup plus grand (10 minutes) pour détruire ces mêmes germes selon une autre technique mettant en jeu des germes normaux, non affaiblis par la dessiccation.

Aussi Bechhold et Ehrlich proposèrent-ils, en 1906, une modification à la méthode des grenats, modification pouvant convenir pour les essais effectués sur des germes de faible résistance. Cette technique, qu'ils désignèrent sous le nom de « méthode à la gélose », consiste à faire agir les solutions désinfectantes sur les colonies des germes sur gélose, et dans le tube même où se trouve la culture.

Quelques modifications furent, par ailleurs, proposées aux méthodes des porte-germes :

En 1898, Defries ⁽⁷¹⁾ proposa de faire agir les antiseptiques sur des cultures bactériennes desséchées au fond de tubes à essais, puis, après rejet de la solution antiseptique et lavage des tubes, d'ajouter un milieu de culture approprié.

En 1907, Sheridan Delépine ⁽⁷⁵⁾ revint à la méthode des fils et indiqua la technique suivante : une culture sur gélose inclinée du germe choisi est émulsionnée dans 2 centimètres cubes de bouillon. On y fait séjourner les fils durant 15 minutes, puis on les laisse sécher dans une boîte de Pétri. Après dessiccation, ces fils sont plongés dans la solution désinfectante pendant 10 minutes, puis, si besoin, traités par des agents précipitant les antiseptiques utilisés, enfin transportés en bouillon, pour déceler les germes encore vivants.

La même année, au Congrès international d'hygiène à Londres, Proskauer ⁽²³³⁾ exposa les travaux de ses collaborateurs Schneider et Seligmann ⁽²⁶⁸⁾. Ceux-ci, dans un travail publié en 1908, revenant aux données de Grüber ⁽¹¹⁹⁾ (1892), et malgré les inconvénients qu'ils constataient dans la méthode des fils, en maintinrent l'emploi pour l'essai des substances fortement antigénétiques.

D'après eux, il est possible d'éliminer presque complètement par lavages l'antiseptique adhérent aux fils, et la méthode peut donner des résultats réguliers si l'on veille à bien observer les conditions suivantes :

- 1° Imprégner régulièrement les fils ;
- 2° Faire en sorte que les solutions désinfectantes puissent atteindre uniformément les fils, en chassant, à l'aide d'une pince stérile, les bulles d'air qui peuvent s'y trouver ;
- 3° Débarrasser soigneusement les fils du désinfectant entraîné, à l'aide d'un réactif chimique approprié ;
- 4° Employer toujours des milieux nutritifs semblables.

D'après les auteurs, cette modification technique présenterait l'avantage de rappeler beaucoup les conditions pratiques de la désinfection, en particulier quand les bactéries sont desséchées sur les fils en présence de matières albumineuses.

Elle permettrait d'éliminer parfaitement l'action antigénétique des désinfectants.

Elle permettrait même, en s'abstenant de laver les fils avant la subculture, de mettre en évidence les propriétés antigénétiques de certaines substances.

En 1922, Reichenbach ⁽²⁴⁶⁾, comparant les avantages réciproques de diverses méthodes, admit que les méthodes des porte-germes présentaient des avantages certains pour l'élimination de l'action antigénétique. Il croyait même être en droit de penser que ces méthodes, contrairement aux méthodes des suspensions, permettraient d'utiliser pour l'essai une grande masse microbienne, sans que l'on ait à craindre la gêne éventuelle provenant d'une trop grande concentration en germes.

Vers la même époque, Hailer ⁽¹²⁶⁾ (1920) utilisait, comme porte-germes, de petits morceaux de batiste. C'est cette méthode qui fut employée, en 1926, par Schmidt-Weyland et Költzsch ⁽²⁶⁶⁾ :

On utilisait des morceaux de batiste de 1 à 2 centimètres, sur lesquels on desséchait, par morceau, II gouttes d'émulsion bactérienne. Chaque morceau était ensuite introduit dans 4 centimètres cubes de solution désinfectante ; après des temps fixés, les morceaux étaient retirés des solutions désinfectantes, lavés plusieurs fois à l'eau distillée, puis chacun d'eux était placé dans un tube de bouillon nutritif.

Quelques années plus tard, Fisher ⁽¹⁰⁰⁾ (1928), revenant aux techniques des « porte-germes », proposa l'emploi pour le transport des bactéries dans les solutions antiseptiques, de petites cuillers de platine iridié. A l'aide d'un dispositif spécial, il faisait tomber sur chaque cuilleron une goutte d'émulsion microbienne filtrée, et l'y laissait sécher. Les cuillerons étaient alors portés, pendant un temps donné, dans la solution antiseptique, traités par un réactif neutralisant l'antiseptique, puis lavés à l'eau. Les germes présents sur les cuillers de platine étaient alors mis en suspension dans l'eau, puis mélangés à du bouillon gélosé, et enfin placés à l'étuve.

Vers la même époque, Reddish ⁽²³⁷⁾ (1927-1928), étudiant des techniques d'essai pour diverses préparations médicamenteuses (huiles, poudres, pâtes, colorants, crèmes et savons antiseptiques), décrivit une méthode se rapprochant de celles des « porte-germes », la méthode « au papier filtre ». En voici le principe :

De petits morceaux de papier filtre (0.5×0.5), sont placés dans un tube à essais bouché au coton, et stérilisés à l'air chaud, à une température ne dépassant pas 170° . Le nombre voulu de ces petits carrés stériles est plongé dans une culture de 24 heures en bouillon de *M. aureus* ; les carrés de papier sont ensuite saisis à l'aide d'un fil de platine recourbé à son extrémité, et plongés dans le produit antiseptique. Ils y sont laissés durant 5 et 15 minutes, puis transportés dans un tube de bouillon de composition donnée. En agitant bien ce tube pendant 5 à 10 minutes, on élimine l'excès d'antiseptique. On peut alors transporter les morceaux de papier dans un autre tube de bouillon (10 centimètres cubes) que l'on met à incuber durant 48 heures à 37° C.

Dans le cas des pommades et onguents antiseptiques, l'auteur décrit une méthode spéciale, utilisant des milieux solides, méthode que nous avons citée parmi les techniques qui déterminent le pouvoir de diffusion des substances étudiées (page 53).

Enfin, en 1929, Lubenau ⁽¹⁸⁶⁾ préconisa l'emploi, comme porte-germes, de petits morceaux de corne, substance convenant particulièrement, d'après l'auteur, à l'essai de l'action en profondeur des désinfectants.

Examen de la valeur des « méthodes des porte-germes ».

Malgré toute la valeur des bactériologistes qui ont préconisé les techniques des « porte-germes », et malgré la logique et le soin avec lesquels ces techniques ont été établies, elles ne sont plus guère utilisées actuellement.

Pour comprendre l'abandon relatif de ces techniques, mises au point par les bactériologistes allemands, au profit, comme nous le verrons plus loin, des méthodes des « coefficients phénol » présentées par les auteurs anglais ou américains, il faut examiner de plus près les avantages et les inconvénients que présentent ces techniques des « porte-germes ».

Les auteurs qui ont préconisé les méthodes des « porte-germes » ont poursuivi deux buts :

En faisant agir l'antiseptique sur des bactéries placées sur des supports inertes, ils pensaient :

1^o Se placer dans les conditions rencontrées dans la nature ;

2^o Se donner ainsi la possibilité, en procédant à des lavages ou à des saturations chimiques, d'éliminer toute trace d'antiseptique avant le transport des germes traités, dans le milieu de subculture.

On sait, en effet, que la petite quantité de substance chimique transportée dans la subculture peut être capable de gêner la multiplication microbienne. Ceci est d'autant plus à craindre que le contact avec l'antiseptique a pu, sans détruire définitivement les microbes, altérer de façon sensible leur vitalité.

Voyons si le but poursuivi par les auteurs a été réellement réalisé :

1^o Il nous paraît maintenant évident que les conditions réalisées dans l'essai des porte-germes ne se retrouvent pas avec la même simplicité dans la nature. En effet, même en laissant de côté l'action antiseptique sur des microbes pathogènes situés dans l'organisme vivant, il nous faut reconnaître que les germes situés dans le monde extérieur ne sont pas simplement déposés sur des objets inertes. Ils sont, soit placés dans des liquides (eaux, liquides d'excrétion ou de sécrétion), soit *enclos* au milieu de particules desséchées, albumineuses le plus souvent, qui leur forment une coque nettement protectrice (crachats, matières fécales desséchées, etc...).

Pour que les conditions de l'essai puissent correspondre vraiment à celles que l'on rencontre dans la nature, il aurait donc fallu que les auteurs tinsent compte de ces derniers faits et qu'ils prissent soin

d'englober de substances protectrices les germes à traiter. Certains auteurs (Schneider et Seligmann) ont, d'ailleurs, essayé de réaliser ces conditions. Mais, de ce fait, les autres conditions de l'essai se trouvaient tout à fait modifiées, et il devenait fort à craindre que les lavages effectués pour éliminer l'antiseptique fussent beaucoup moins opérants.

2° Est-il possible d'éliminer par lavages à l'eau ou par saturations chimiques, selon la technique préconisée par les auteurs, toute trace de substance antiseptique ?

D'autre part, cette manipulation supplémentaire n'est-elle pas susceptible de nuire à la réussite de l'essai ?

a) Disons tout de suite qu'il ne nous semble pas que le procédé d'élimination de l'antiseptique par saturation chimique ait rempli le but cherché par les auteurs.

En effet, traiter des germes, après une application préalable de sublimé ou de phénol, par le sulfhydrate d'ammoniaque ou par la soude, puis, après repiquage dans un milieu de subculture, conclure à la valeur pratique des antiseptiques mis en cause, nous paraît être fort discutable.

Il est, en effet, évident que nous nous éloignons ainsi tout à fait des conditions réalisées dans la nature. Par ailleurs, ces procédés de saturation chimique ne peuvent pas avoir une valeur générale. De plus, il est indiscutable que nous modifions ainsi l'action antiseptique, à un degré qu'il nous est impossible de mesurer. Enfin, les neutralisants chimiques que nous faisons agir, en second lieu, ne sont pas des substances inertes, mais des corps tels que le sulfhydrate d'ammoniaque ou la soude, qui peuvent exercer par eux-mêmes des actions antimicrobiennes.

Ces essais de saturation chimique, s'ils peuvent présenter un certain intérêt théorique pour nous faire mieux comprendre le mécanisme de l'action désinfectante, ne nous semblent pas offrir un grand intérêt pratique pour la mesure des valeurs antibiotiques.

b) Les lavages des porte-germes, préalablement traités par l'antiseptique, à l'eau distillée ou à l'eau rendue plus ou moins isotonique, ont-ils répondu aux espoirs que mettaient en eux les auteurs allemands ?

Nous pensons que cet espoir a été réalisé souvent. Certes, il est encore possible d'admettre que les couches microbiennes ne sont pas réparties également sur les supports inertes, et que, de ce fait, il peut se faire des accumulations de corps microbiens, particulièrement dans les interstices des porte-germes. Aussi, peut-être est-il possible que la substance antiseptique pénètre beaucoup moins rapidement en certains endroits qu'en d'autres, et que, si elle y est parvenue, elle s'élimine avec le même retard. Mais laissons cette objection qui nous paraît tenir à des conditions techniques défectueuses, mais inévitables. Un reproche un peu plus grave nous semble pouvoir être élevé contre cette technique :

Dans les cas où les auteurs ont choisi comme support de leurs germes desséchés des substances organiques telles que des fils de soie, de lin, ou des morceaux de batiste, nous pensons que ces supports ne se comportent pas, vis-à-vis des antiseptiques, comme des substances inertes.

Dans certains cas, il se fait avec ces substances organiques des combinaisons chimiques stables que des lavages ultérieurs n'arrivent pas à

détruire complètement. Il peut donc y avoir, de ce fait : 1^o absorption d'une certaine quantité d'antiseptique par autre chose que les germes ; 2^o transport dans la subculture de substances chimiques capables de gêner ultérieurement la multiplication des germes.

Ainsi, nous voyons, dans les travaux de Lange, que les désinfectants agissent nettement mieux sur morceaux de batiste que sur grenats. Il est vraisemblable que ce fait résulte de l'impossibilité, où l'on est, d'éliminer complètement les antiseptiques capables de former avec la cellulose des combinaisons stables. Ce sont ces constatations qui firent abandonner par Geppert la méthode des fils et le conduisirent à proposer, l'un des premiers, la méthode des suspensions.

Cependant, à notre avis, ces reproches n'ont pas une importance suffisante pour que nous puissions condamner, en nous basant sur eux seuls, les techniques que nous venons d'examiner. Il est possible de faire à ces procédés des objections beaucoup plus graves, objections qui nous ont entraînée à ne pas retenir, pour nos essais, ces techniques des « porte-germes » :

1^o Comme nous le montrerons plus loin, le nombre des germes mis en expérience, pour l'essai d'un désinfectant, doit être absolument connu. Il est tout aussi nécessaire de définir la quantité des germes que la quantité de substance antiseptique que l'on fait agir sur eux. Or, dans les techniques des « porte-germes », nous ignorons, d'une part, la quantité de germes desséchés portée par chaque support et traitée par l'antiseptique, et, d'autre part, ayant éliminé, malgré toutes les précautions prises, un nombre inconnu de germes, nous ignorons encore plus la quantité des germes repiqués. Nous n'avons même pas de cette quantité une idée approximative ;

2^o Les auteurs préconisent, pour fixer les germes sur les porte-germes, de lessoumettre à une dessiccation de plusieurs heures. Cette dessiccation, qui peut fort bien s'admettre pour des germes sporulés, sur lesquels travaillaient Paul et Krönig, semble être extrêmement dangereuse pour les germes non sporulés, que nous employons en majorité actuellement. Ce traitement préliminaire entraîne, sans aucun doute, un abaissement de la vitalité des germes. Ces germes sont ainsi rendus plus sensibles à l'action nocive des substances antiseptiques.

Pour ces raisons, primordiales, nous croyons donc devoir écarter la méthode des « porte-germes », et, suivant en cela l'exemple d'un certain nombre d'auteurs, donner plus de confiance à la méthode des « suspensions ».

B. — MÉTHODES DES SUSPENSIONS

Après avoir examiné les méthodes dites des « porte-germes », il nous faut maintenant considérer un second groupe de méthodes de mesure proposées pour apprécier la valeur antibiotique, méthodes basées sur

une tout autre idée. C'est le groupe des méthodes dites « des suspensions ».

Elles consistent à mettre directement en contact, dans un milieu liquide quelconque, l'antiseptique et les germes à détruire, à transporter, après un certain temps, une fraction du mélange dans un milieu de subculture et à voir si les microbes ainsi transportés se développent.

Le principe de ces méthodes est donc d'une extrême simplicité. Aussi, ces méthodes furent-elles conçues les premières. Mais, rappelons-le, on les abandonna assez vite, ayant reconnu, à leur utilisation, le grand inconvénient suivant :

En prélevant une fraction de la suspension bactérienne traitée par le désinfectant, pour la transporter dans le milieu de subculture, on entraîne nécessairement, en même temps que les germes, une petite quantité du désinfectant. Or, cette petite quantité peut suffire parfois à arrêter le développement ultérieur des germes dans le milieu de subculture. Ceci d'autant plus que ces germes, du fait de leur contact antérieur avec le désinfectant, ont, sans être détruits définitivement, subi souvent une notable diminution de vitalité.

Comme nous l'avons vu plus haut, la méthode des « porte-germes » avait été imaginée pour tourner cette difficulté. Mais cette dernière s'étant montrée, par bien des points, défectueuse, on revint bientôt à la méthode des suspensions.

Nous allons donc examiner, maintenant, les nombreuses techniques basées sur l'utilisation des suspensions microbiennes, en insistant plus particulièrement sur certaines d'entre elles, devenues officielles dans les pays anglo-saxons : les méthodes des « coefficients phénol ».

Parmi les méthodes « des suspensions », il nous faut distinguer plusieurs catégories, qui diffèrent entre elles par le mode d'évaluation des résultats obtenus au cours des essais :

Certains auteurs, constatant la grande difficulté que l'on rencontre pour réaliser, au cours de divers essais, des conditions absolument identiques, ont pensé que le seul moyen d'obtenir des résultats exacts était d'effectuer, dans chaque cas, un essai comparatif, exactement semblable, avec un désinfectant pris comme étalon. Les désinfectants alors en usage étant particulièrement des corps de nature phénolique, ils ont naturellement choisi le phénol comme terme de comparaison ; ils ont déterminé la valeur antibiotique de la substance étudiée et l'ont comparée à la valeur antibiotique du phénol mesurée dans les mêmes conditions. Ainsi sont nées les diverses techniques connues sous le nom de *méthodes du coefficient phénol*. Les résultats des essais s'y trouvent donc exprimés en *valeurs relatives*.

Cependant ces méthodes n'apportent pas, comme nous le verrons plus loin, des résultats d'une valeur générale suffisante.

Aussi, de nombreux auteurs essayèrent-ils de déterminer les valeurs antibiotiques de *façon absolue*, c'est-à-dire d'établir, avec le maximum de précision, la dose de substance qu'il suffit d'ajouter, dans des conditions données, à une quantité connue d'un milieu rigoureusement déterminé, pour y assurer la destruction de germes dont la qualité et la quantité ont été, aussi bien que possible, définies.

Nous aurons donc à examiner successivement :

1^o Les méthodes des « coefficients phénol », qui expriment les pouvoirs antibiotiques en *valeur relative* ;

2^o Les diverses techniques proposées pour la mesure en *valeur absolue* des pouvoirs antibiotiques.

Avant d'aborder l'étude détaillée de ces méthodes, nous passerons rapidement en revue les premiers essais de mesure de la valeur antibiotique effectués par la méthode des suspensions.

Il faut arriver à 1883 pour trouver une ébauche nette de la méthode des suspensions :

A cette époque, Settler ⁽²⁷⁷⁾ essayait de produire des cultures de bactéries en présence de différentes solutions antiseptiques, et il mettait en évidence la multiplication des bactéries par des repiquages ultérieurs.

Hueppe ⁽¹⁴⁶⁾, en 1886, transportait en bouillon, pour voir s'il y avait encore multiplication bactérienne, de petites quantités de cultures microbiennes mélangées à l'antiseptique à étudier.

Liborius, en 1887, et V. Esmarch ⁽⁹⁴⁾, en 1889, proposèrent de faire agir l'antiseptique directement sur les germes en suspension dans le bouillon où ils avaient été cultivés.

Sternberg ⁽²⁸³⁾, en 1888, décrivit une méthode, qu'il utilisait depuis 1881, servant à déterminer la quantité minima de divers désinfectants capable de détruire en deux heures l'organisme microbien utilisé. Il opérait de la façon suivante : une quantité connue de culture récente était mélangée à une égale quantité de solution désinfectante étalon. Après un contact de deux heures, une à deux anses étaient prélevées dans le mélange etensemencées dans un milieu nutritif.

Miquel ⁽¹⁹⁵⁾ proposa également d'ajouter directement « les cultures à doses massives aux solutions antiseptiques ».

À la même époque, Wynter Blyth ⁽²⁷⁾, 1886, mettait en contact, pendant un certain temps, des quantités connues d'émulsion microbienne en eau distillée et de solutions désinfectantes. Puis il transportait une goutte du mélange en gélatine nutritive liquéfiée, qu'il coulait en plaques.

Tetrop ⁽²⁹¹⁾ (1889), Heule ⁽¹³⁶⁾ (1889), Heider ⁽¹³²⁾ (1891), utilisèrent des techniques analogues.

La première réforme apportée à ces divers essais eut pour but de réduire au minimum la quantité des substances étrangères présentes dans le mélange bactéries-désinfectant. Pour y arriver, on mélangea de faibles quantités d'émulsion bactérienne à de grandes quantités de solution antiseptique.

En 1892, Max Grüber ⁽¹¹⁹⁾, dans un mémoire très important présenté au VII^e Congrès d'hygiène international à Londres, montra que les diverses méthodes alors employées présentaient de nombreuses sources d'erreur. Se ralliant aux données antérieures de Geppert ⁽¹¹¹⁾, il donna les règles à suivre au cours d'un essai de désinfection. Ces règles, que Grüber formula le premier avec une grande netteté, et dont la valeur n'a pas diminué, sont les suivantes :

1^o Il faut tenir compte de la résistance variable des cultures micro-

biennes utilisées, même si l'on se borne à employer une espèce unique ;

2° Il est nécessaire de placer les germes, après action du désinfectant, dans les conditions de milieu et de température les plus favorables à leur développement ;

3° Il faut éviter le transport dans les subcultures de traces d'antiseptique auxquelles les bactéries sont d'autant plus sensibles qu'elles ont été plus endommagées par leur contact avec le désinfectant ;

4° Les subcultures doivent être observées pendant huit à dix jours au moins, la poussée y étant souvent tardive ;

5° Il faut noter l'importance du milieu dans lequel se produit l'action de l'antiseptique sur les germes, et notamment les modifications apportées par la présence d'albumine ;

6° La température doit être soigneusement considérée ;

7° Il faut assurer l'homogénéité, par filtration, de la suspension bactérienne ;

8° Le procédé des fils de soie n'est pas à conseiller, car il est très difficile d'éliminer le désinfectant, surtout lorsque celui-ci donne des précipités par lavages ;

9° L'inoculation à l'animal du mélange désinfectant n'est pas non plus recommandable, car l'infection fait souvent défaut, par suite de la présence de traces de l'antiseptique.

Aussi, pour éviter toutes ces sources d'erreur, Grüber proposa-t-il la technique suivante : on prépare une émulsion de la culture d'épreuve suffisamment épaisse pour que, après une dilution au 1/2 000, il reste encore dans chaque goutte plusieurs centaines de germes. Cette suspension est filtrée et mélangée à une égale quantité de solution désinfectante à double concentration. Après un temps de contact déterminé, des gouttes du mélange sont prélevées et transportées en bouillon de viande peptoné. Avec cette première dilution, on en fait une deuxième en bouillon, puis une troisième à partir de celle-ci, afin d'éviter l'influence inhibitrice du désinfectant. La subculture est mise à l'étuve, et observée après dix jours.

Enfin, pour essayer la résistance des cultures employées, une partie de la suspension est traitée par un désinfectant connu.

Nous insistons sur le fait que, dans ce travail de Grüber, se trouvent la plupart des principes nécessaires à la bonne conduite de l'essai d'un désinfectant. Ce sont les données exposées si nettement par Grüber, que nous verrons développées et précisées ultérieurement par d'autres auteurs. La plupart des difficultés à résoudre dans l'essai de désinfection ont donc été parfaitement reconnues par les tout premiers auteurs qui se sont occupés de la question. Cependant, cette question n'a progressé que lentement dans les vingt dernières années du XIX^e siècle. Chacun s'est préoccupé de décrire la méthode qu'il employait lui-même, sans chercher à établir un procédé général, utilisable par tous et applicable à tous les désinfectants.

Les premiers auteurs qui proposèrent un procédé « standard » d'essai des désinfectants furent, en 1903, deux Anglais, Rideal et Walker ⁽²⁵⁴⁾. Ils décrivirent la première des méthodes dites du *coefficient phénol*, que nous allons examiner maintenant.

I. — MÉTHODES DU " COEFFICIENT PHÉNOL "

A. — *Technique originale de Rideal et Walker.*

« *Rideal Walker Test.* »

Au moment où les auteurs proposèrent leur technique, les désinfectants les plus employés appartenait au groupe du phénol. Ils étaient destinés à détruire, sur les objets contaminés, les germes pathogènes, et principalement les bacilles responsables des épidémies de typhoïde. Il sembla donc logique aux auteurs cités d'apprécier la valeur de ces désinfectants phénoliques en comparant leur activité à celle du phénol pris comme étalon, et d'utiliser pour l'essai un des microbes du groupe typhique-coli. Il en résulta une méthode d'essai comparatif, basée sur le procédé des suspensions, et consistant à déterminer la concentration du désinfectant étudié capable de détruire une quantité donnée de germes, dans le même temps que pouvait le faire une concentration donnée de phénol. Le rapport entre les concentrations antibiotiques de la substance étudiée, d'une part, et du phénol, d'autre part, ces deux chiffres étant obtenus dans des conditions identiques déterminées, est appelé « coefficient phénol » et exprime la valeur antibiotique relative de la substance.

La méthode ainsi proposée par Rideal et Walker porte, pour une raison simple que nous verrons plus loin, le nom de *méthode à la goutte*.

Elle constitue la méthode officielle en Angleterre, et toutes les méthodes ultérieurement proposées, et admises officiellement dans d'autres pays, n'en sont que des modifications.

Nous donnons ci-dessous la description de cette technique :

Technique de l'essai. — On prépare quatre dilutions différentes du désinfectant essayé, dilutions convenant aux conditions de l'essai.

Un volume de 5 centimètres cubes de chacune de ces dilutions est introduit dans un tube à essai stérile, et on ajoute, dans chacun de ces quatre tubes, V gouttes (d'où le nom donné à la technique), d'une culture de 24 heures à 37° de bacille typhique, en bouillon de composition déterminée (extrait Liebig, 2 p. 100, peptone de Witte, 2 p. 100, NaCl, 1 p. 100).

On laisse un intervalle d'une demi-minute entre les additions de culture microbienne dans chacun des tubes.

Deux minutes et demie après avoir mélangé l'antiseptique et la culture bactérienne, on effectue dans chaque tube, à l'aide d'une anse de platine d'un diamètre intérieur de 2 millimètres, un prélèvement que l'on ensemence dans 5 centimètres cubes du bouillon défini plus haut. Ces prélèvements, pour chacun des tubes, sont répétés de 2 minutes et demie en 2 minutes et demie, c'est-à-dire au bout de : 5, 7 et demie, 10, 12 et demie et 15 minutes. Ces intervalles de 2 minutes et demie sont nécessaires, pour respecter les intervalles d'une demi-minute entre les prélèvements effectués dans chacun des tubes.

L'essai est fait à une température de 15 à 18° C., puis les tubes de subculture sont portés à l'étuve à 37° C.

Une série d'essais absolument semblable est effectuée avec une solution de phénol de concentration telle que la stérilisation des germes soit obtenue entre les temps limites de 2 minutes et demie et de 15 minutes. Les dilutions de phénol sont préparées à partir d'une solution mère de phénol purifié à 5 p. 100. Comme précédemment, l'essai est fait à la température de 15 à 18° C., et les tubes de subculture sont placés à l'étuve à 37° C.

Au bout de 48 heures, les tubes de subculture préparés avec les dilutions du désinfectant étudié et ceux préparés avec la solution de phénol sont examinés. On calcule alors, aussi bien pour le désinfectant étudié que pour le phénol, la dilution qui, incapable de tuer les germes en 5 minutes, les a tués en 7 minutes et demie. Si deux dilutions donnent les mêmes résultats, on choisit, pour le calcul, la solution la plus diluée, c'est-à-dire la moins chargée en désinfectant. (Voir le tableau ci-dessous.)

On fait alors le rapport des dilutions des deux substances qui donnent le résultat précis, et on obtient ainsi : $\frac{\text{dilution du désinfectant}}{\text{dilution du phénol}}$, ce qui représente le « coefficient phénol » du désinfectant.

Nous insistons particulièrement sur le fait que le contact de l'antiseptique et des microbes se produit dans un bouillon de culture, et, par conséquent, en présence d'albumine.

Nous donnons ci-dessous un exemple de détermination du coefficient phénol, selon la technique originale de Rideal et Walker (tableau I).

TABLEAU I

DÉTERMINATION DU COEFFICIENT PHÉNOL DU DÉSINFECTANT « A ».
Méthode de *Rideal et Walker*.

Température de l'essai : 19° C.; organisme témoin : *bacille typhique*,
âgé de 24 heures, cultivé en bouillon.

Désinfectant et dilutions.	Temps d'exposition en minutes.					
	2 1/2	5	7 1/2	10	12 1/2	15
<i>Désinfectant « A » :</i>						
1/1 700.....	+	—	—	—	—	—
1/2 000.....	+	+	—	—	—	—
1/2 300.....	+	+	+	—	—	—
1/2 600.....	+	+	+	+	+	—
<i>Phénol :</i>						
1-110.....	+	+	—		—	—
N. B. — : Subculture négative.						
+ : Subculture positive.						

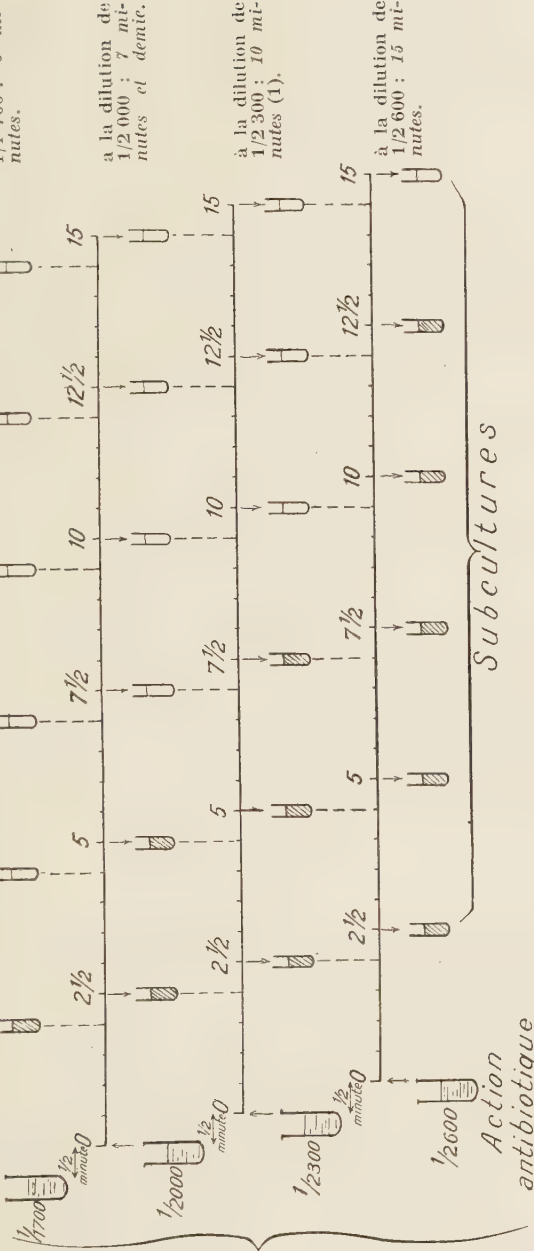
Nous représentons également le dispositif schématique de l'essai (fig. 1).

Dans cet exemple, nous prenons, pour déterminer le coefficient phénol du désinfectant étudié :

1° La plus forte dilution du désinfectant capable de tuer les germes ne sept minutes et demie : 2 000.

Temps auxquels sont effectués les prélèvements dans le mélange: Solution désinfectante + culture microbienne.

(Minutes)
Mise en contact du désinfectant et des germes.



Le temps nécessaire pour la stérilisation est : à la dilution de 1/1 700 : 5 minutes.

à la dilution de 1/2 000 : 7 minutes et demie.

à la dilution de 1/2 300 : 10 minutes (1).

à la dilution de 1/2 600 : 15 minutes.

Dilution de phénol + V gouttes de culture microbienne.

Subcultures positives
Subcultures négatives

Fig. 1. — Détermination du coefficient phénol d'un désinfectant. (Méthode de RIDEAL et WALKER.)

(1) Cette dilution correspond, par définition, aux exigences de l'essai. Elle sert à calculer le "coefficient phénol".

2° La plus forte dilution de phénol capable de tuer les germes en sept minutes et demie : 110.

Le coefficient phénol du désinfectant « A » est calculé en faisant le rapport de ces deux nombres. Il est donc :

$$\frac{2\,000}{110} = 18,2.$$

Le *Rideal Walker Test* fut bientôt l'objet de diverses critiques et plusieurs auteurs suggérèrent des modifications possibles. La tendance dominante fut de rapprocher les conditions de l'essai des conditions pratiquement rencontrées dans la désinfection.

Kenwood et Hewlett (¹³⁹), en 1906, montrèrent que l'activité du phénol était fortement atténuée par la présence de matières fécales ou d'urine. Après de longues controverses, l'opinion générale se rallia à leur avis et on chercha à mesurer l'action des désinfectants, en présence des substances qui se trouvent habituellement, dans la nature, au contact des microbes à détruire. Somerwille et Walker (²⁸⁰), en 1906, proposèrent de choisir comme substance organique à ajouter au mélange germes-antiseptique de l'amidon, des protéines, ou de la gélatine. Les matières fécales proposées par d'autres auteurs étaient, à leur avis, de composition trop inconstante pour qu'on pût les employer. De leur côté, Wynter Blyth (²⁷) (1906) et Fowler (¹⁰³) (1906) préconisèrent respectivement l'addition de lait et l'addition d'urine au milieu d'essai.

C'est alors que fut publié, en 1908, le très important et très minutieux travail de Miss Chick, en collaboration avec C.-J. Martin (⁵⁰). Ces auteurs entreprirent une étude détaillée de l'influence de la matière organique sur le pouvoir germicide des désinfectants, ce qui les amena à proposer une modification du *Rideal Walker Test*.

B. — Modifications du « Rideal Walker Test » proposées par Miss Chick et C.-J. Martin.

Ayant étudié, dans un travail antérieur, la nature du processus de désinfection, et les lois auxquelles il obéit, les auteurs purent facilement établir les conditions qui devaient être satisfaites pour une bonne comparaison des valeurs germicides. Ils s'attachèrent particulièrement à étudier, d'une part, l'influence du temps, d'autre part, l'influence de diverses matières organiques, en suspension ou en solution, sur les activités antibiotiques.

Les deux principales modifications qu'ils proposèrent à la méthode de Rideal et Walker furent :

1° L'adoption d'un temps constant pour l'essai ;

2° L'essai en présence de matières organiques.

1° Ils insistèrent sur la nécessité de choisir, pour tout essai de stan-

dardisation des désinfectants, un temps de contact constant entre l'antiseptique et les germes. Les auteurs avaient, en effet, remarqué que, dans la méthode de Rideal et Walker, ces temps de contact pouvaient, dans les meilleures conditions, varier de cinq minutes à sept minutes et demie, soit d'un tiers. Or, ils avaient observé que la rapidité d'action des divers désinfectants n'était nullement comparable, et notamment qu'une action plus longue de quelques minutes aidait puissamment la désinfection par les métaux lourds (HgCl_2 et No^3Ag), alors qu'elle n'agissait qu'à peine sur la désinfection par le phénol. Il en résultait une grande variation du coefficient phénol des métaux lourds, selon le temps exact choisi pour le déterminer. Ces constatations sont visibles dans le tableau que nous donnons ci-dessous, et qui est tiré d'un travail de Chick et Martin ⁽⁵⁰⁾.

TABLEAU II

« B. PARATYPHOSUS », 20° C.

Désinfectant.	Temps de désinfection en minutes.	Concentration du désinfectant, grammes p. 1000.	Coefficient phénol.
HgCl_2	2 1/2	0.88	136
Phénol.....	2 1/2	12	
HgCl_2	10	0,06	
Phénol.....	10	10,4	173
No^3Ag	2 1/2	0,068	
Phénol.....	2 1/2	12	176
No^3Ag	10	0,015	
Phénol.....	10	10,4	693

Les auteurs considérèrent qu'un temps de contact de trente minutes entre les bactéries et le désinfectant était conforme à la fois aux conditions pratiques de la désinfection et aux conditions d'exécution des essais en série effectués au laboratoire. Ils proposèrent donc une « modification du *Rideal Walker Test*, nécessitée par l'adoption d'un temps constant». En voici le principe :

On place au bain-marie, à une température de 20°, une série de tubes contenant 5 centimètres cubes de solutions en eau distillée, du désinfectant étudié, à diverses concentrations. Quand les tubes ont acquis la température du bain-marie, on y ajoute, à l'aide d'une pipette standard (donnant 0^{cc},02 par goutte), V gouttes de culture en bouillon de 24 heures de *B. typhosus*. Le temps étant enregistré à l'aide d'un chronographe, on laisse s'écouler exactement une minute entre chaque ensemencement. Trente minutes après l'ensemencement du premier tube, on prélève, avec une anse de platine standard, un échantillon que l'on enseme dans 10 centimètres cubes de bouillon glucosé contenant du tournesol ; on effectue cet ensemencement dans deux tubes semblables.

Puis on opère de même pour chacun des tubes où a lieu le contact antiseptiques-microbes. Les échantillons prélevés pour les subcultures représentent, dans les conditions de l'essai, environ 1/300 du volume total (solution désinfectante, 5 centimètres cubes,

V gouttes de culture). L'essai revient donc à vérifier s'il y a eu, ou non, destruction des germes sur la trois centième partie du nombre des bactéries mises en expérience.

Alors que, dans le *Rideal Walker Test*, nous pouvions, pour obtenir le résultat cherché, faire varier deux facteurs : concentration et temps, nous avons ici un facteur fixe : le temps ; et un seul facteur variable : la concentration. Ceci nous oblige donc, pour obtenir des résultats suffisamment exacts, à effectuer nos essais avec des dilutions désinfectantes, de titres assez voisins. Le nombre des dilutions essayées sera donc plus grand que dans la méthode de Rideal et Walker.

Remarquons, par ailleurs, que l'action antibiotique s'exerce ici dans un milieu relativement peu chargé en matières organiques (eau distillée, additionnée de la petite quantité de bouillon qui accompagne les microbes). Ceci constitue donc une autre différence avec le *Rideal Walker Test*, et avec les autres techniques de Chick et Martin, que nous allons examiner rapidement.

2° Miss Chick et C.-J. Martin insistèrent encore sur la nécessité d'examiner l'influence des matières organiques sur les valeurs antibiotiques et d'établir une méthode de standardisation des désinfectants en leur présence. Ils choisirent, dans ce but, la présence de matières fécales desséchées et finement pulvérisées, dont l'influence, au cours d'essais préliminaires, s'était montrée très régulière. La technique utilisée était celle de Rideal et Walker, mais le temps d'action du désinfectant était fixé à trente minutes :

Les matières fécales sont desséchées, puis tamisées, et des quantités de 0g,15 sont placées dans des tubes à essais, avec 2cc,5 d'eau distillée. On stérilise le tout 10 minutes à 120°. On ajoute, dans chaque tube, des quantités différentes de dilutions convenables du désinfectant et suffisamment d'eau distillée pour avoir un volume total de 5 centimètres cubes.

La proportion de matières fécales dans le milieu est donc de 3 p. 100. La suite de l'essai s'effectue comme l'essai précédemment décrit en eau distillée.

En dehors de ces deux modifications, les auteurs ne firent pas subir d'autres changements à la méthode de Rideal et Walker. Ils considérèrent que le *bacille typhique* pouvait, à juste titre, être choisi comme organisme témoin, étant un agent pathogène fréquent, dont les propriétés vitales et, notamment, la résistance, peuvent être considérées comme de valeur moyenne. D'autre part, les cultures en bouillon, qui, nous le rappelons, sont utilisées directement comme suspensions d'épreuve, fournissent, d'après Chick et Martin, des suspensions suffisamment homogènes pour l'essai.

C. — Modification au « Rideal Walker Test » proposée par la Commission du journal « The Lancet ».

En 1909, une commission du journal *The Lancet* proposa, sous l'inspiration des bactériologistes Woodhead et Ponder⁽³¹⁰⁾, une modification de la méthode de Rideal et Walker, connue sous le nom de *Lancet Commission Coefficient*⁽¹⁷²⁾.

Les auteurs, ayant utilisé, dans des essais en série, la technique de Rideal et Walker, ne purent, même après un usage prolongé de la méthode, obtenir des coefficients phénol réguliers. Ils reprochèrent en outre aux auteurs du *Rideal Walker Test* de se placer, pour l'essai, dans des conditions trop différentes de la pratique. Ils proposèrent donc d'apporter les modifications suivantes au *Rideal Walker Test* :

1^o L'organisme utilisé pour l'essai était le colibacille, âgé de 24 heures, en culture sur bouillon effectuée à 37° C. Les auteurs proposèrent l'emploi de ce germe en raison des propriétés particulières qu'il possède de se développer avec une facilité relative dans les milieux additionnés de sels biliaries. Ces milieux étaient choisis comme milieux de subculture, de sorte que la poussée d'autres germes apportés par contamination accidentelle devenait beaucoup moins facile et était beaucoup plus aisée à déceler. Par ailleurs, cet organisme présente, d'après les auteurs, des caractères biologiques constants lorsqu'il est employé en bouillon de composition déterminée. Enfin, il n'est pas pathogène.

Pour obtenir une suspension régulière des germes, les auteurs proposèrent d'émulsionner la culture de colibacille (âgée de 24 heures, effectuée à 37° C., en bouillon standard), par agitation vigoureuse en tubes scellés. L'émulsion ainsi obtenue était ensuite filtrée sur papier.

2^o Le phénol utilisé comme antiseptique de comparaison était prélevé sur une réserve de phénol purifié, aussi abondante que possible. Les dilutions de phénol utilisées pour l'essai devaient être préparées depuis vingt-quatre heures au plus.

3^o L'antiseptique et les germes étaient maintenus en contact pendant des temps plus longs. Les prélèvements étaient effectués dans le mélange à intervalles réguliers, de deux minutes et demie en deux minutes et demie, non plus pendant quinze minutes, mais pendant trente minutes.

4^o Pour le transport des germes dans les milieux de subculture, un appareillage spécial fut utilisé. Il consistait en une série de petits cuillérons de platine. Afin de permettre leur stérilisation et leur refroidissement rapides, une roue dentée, mue automatiquement, les prenait et les faisait passer tour à tour dans la flamme d'un bec Bunsen, puis les entraînait sur un support pour les laisser refroidir. L'emploi de ces cuillérons nécessitait l'usage de petits récipients en verre, d'ouverture relativement large, qui remplaçaient les tubes à essais, bouchés au coton, habituellement employés pour ces essais. Ces récipients restaient ouverts durant l'essai. Les auteurs estimaient l'essai suffisamment protégé contre les contaminations possibles, d'une part, par l'addition de sels biliaries au milieu de subculture, d'autre part par la constatation possible, dans ce milieu, des réactions propres au colibacille, ce qui permettait de déceler facilement la présence de germes étrangers.

5^o Le milieu de subculture utilisé était le milieu à la bile de Mc Conkey, de formule suivante :

Taurocholate de soude.....	5 grammes.
Glucose	5 —
Peptone	20 —
Tournesol Merck puriss. à 5 p. 100	100 centimètres cubcs.
Eau distillée..... q. s. p.	1 litre.

La poussée du colibacille s'y manifestait par virage au rouge et production de gaz.

6° La quantité du mélange bactéries-désinfectant prélevée pour la subculture dans le *Rideal Walker Test* (qui était, rappelons-le, d'une anse de platine standard pour 5 centimètres cubes) fut jugée trop petite. Les auteurs, en utilisant leurs petites cuillers de platine, augmentaient d'au moins trois fois la quantité transportée dans la subculture.

7° Le mode de calcul du coefficient fut également modifié : on déterminait, d'une part, la valeur du coefficient, pour une période d'action de deux minutes et demie et, d'autre part, sa valeur pour une période d'action de trente minutes. La moyenne de ces deux chiffres était prise comme « coefficient phénol réel » de la substance étudiée.

Les diverses dilutions de l'antiseptique en eau distillée sont préparées, puis réparties à raison de 5 centimètres cubes, dans de petits récipients étiquetés. On les ensemeence successivement avec l'émulsion microbienne à l'aide d'un petit « cuilleron », en retirant toujours celui-ci à la même cadence, pour assurer l'ensemencement régulier d'une même quantité de germes.

Au bout de 2 minutes et demie, des échantillons sont prélevés dans chaque mélange. Le processus est renouvelé après 5, 7 et demie, 12 et demie, 15, 20, 25 et 30 minutes.

Remarquons que, pendant les 15 premières minutes, les prélèvements s'effectuent à des temps très rapprochés. En effet, le rythme des prélèvements est aussi rapide que dans le *Rideal Walker Test* (de 2 minutes et demie en 2 minutes et demie) ; mais le nombre des dilutions mises en expérience dans la méthode du *Lancet* (de 10 à 12) est nettement supérieur au nombre des dilutions essayées dans la technique de Rideal et Walker (4). Effectuer ainsi, à la suite, douze prélèvements et repiquages réguliers en 2 minutes et demie, nous semble à peu près impossible avec les méthodes habituelles, mais serait, d'après les auteurs de la méthode, tout à fait réalisable avec le dispositif mécanique qu'ils préconisent.

Immédiatement après, on recommence l'expérience avec les dilutions convenables de phénol. Après 2 minutes et demie et 5 minutes de contact avec les germes, on prélève des échantillons dans les solutions de phénol les moins diluées, et, après 25 minutes et 30 minutes, des échantillons dans les solutions les plus diluées.

La température ambiante doit toujours être comprise entre 62° et 67° Fahrenheit (16° à 20° C.).

Les milieux de subculture sont mis à incuber 48 heures à 37° C.

Le calcul du coefficient phénol est effectué comme suit : on divise le chiffre représentant la concentration p. 100 de la solution la plus diluée de phénol encore létale par le chiffre représentant la concentration p. 100 de la solution la plus diluée du désinfectant essayé encore létale.

Ce calcul est effectué, pour la période de contact de 2 minutes et demie et pour celle de 30 minutes, la moyenne des deux chiffres est prise comme résultat et représente le coefficient phénol du désinfectant étudié.

Nous donnons ci-dessous un exemple de détermination du coefficient phénol selon la technique du *Lancet*.

TABLEAU III

DÉTERMINATION DU COEFFICIENT PHÉNOL DU DÉSINFECTANT

« JEYES LIQUIDE » (CRÉSOL COMMERCIAL).

Méthode du *Lancet*.

Température de l'essai : 18° à 20° C.; organisme témoin : colibacille, âgé de 24 heures, cultivé en bouillon.

Désinfectant :		Temps d'exposition en minutes.								
Dilutions.	Concentra- tions p. 100.	2 1/2	5	7 1/2	10	12 1/2	15	20	25	30
1/75	1,33	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1/100	1,00	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1/125	0,80	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1/150	0,666	+	—	—	—	—	—	—	—	—
1/175	0,571	+	+	+	—	—	—	—	—	—
1/200	0,500	+	+	+	—	—	—	—	—	—
1/225	0,444	+	+	+	—	—	—	—	—	—
1/250	0,400				+	+	+	—	—	—
1/275	0,363				+	+	+	+	—	—
1/300	0,333									—
1/325	0,307						+	+	+	+
1/350	0,286								+	+
Phénol :	1,10	—	—							
	1,00	+	—							
	0,917	+	+							
	0,846	+	+							
	0,786								—	—
	0,733								+	+
	0,687								+	+
	0,647								+	+

— = Subculture négative.

+ = Subculture positive.

Dans cet exemple, nous prenons, pour calculer le coefficient phénol :

1° La dose p. 100 de crésol, la plus faible, capable de détruire les germes en 2 minutes et demie : 0,80 ;

2° La dose p. 100 de crésol, la plus faible, capable de détruire les germes en 30 minutes : 0,333 ;

3° La dose p. 100 de phénol, la plus faible, capable de détruire les germes en 2 minutes et demie : 1,10 ;

4° La dose p. 100 de phénol, la plus faible, capable de détruire les germes en 30 minutes : 0,786.

$$\text{Le coefficient phénol est donc : } \frac{\left(\frac{1,10}{0,80} + \frac{0,786}{0,333} \right)}{2} = 1,8.$$

D'après les auteurs, les résultats obtenus selon cette technique sont beaucoup plus réguliers qu'avec la méthode de Rideal et Walker.

La publication de cette technique valut à la commission du *Lancet* une réponse de Samuel Rideal ⁽²⁵¹⁾ qui apporta à la nouvelle technique les objections suivantes :

1^o Le temps de contact de 30 minutes est trop long, car, généralement, l'on demande à un désinfectant d'agir rapidement ;

2^o La modification de température (16^o à 20^o au lieu de 15^o à 18^o C.) n'offre aucun avantage pratique, ni aucune justification scientifique ;

3^o Aucune contamination n'est à craindre avec le *Rideal Walker Test*, ce qui n'est peut-être pas le cas avec des récipients ouverts à l'air libre ;

4^o Il peut être avantageux d'employer un organisme plus résistant que le bacille typhique, mais l'on ne peut admettre que le colibacille soit moins variable que lui ;

5^o Le bouillon peptoné salé permet aux germes, mieux que le milieu bilité, de retrouver leur vitalité ;

6^o Les « cuillères », qui transportent un volume relativement grand de liquide, doivent souvent entraîner dans la subculture suffisamment d'antiseptique pour empêcher les germes d'y pousser ;

7^o Enfin, la valeur germicide des dilutions de phénol ne diminue pas aussi vite que veulent bien le dire les auteurs.

Pour notre part, il semble que l'on puisse encore faire à la technique du *Lancet* une autre objection. Il nous paraît critiquable d'effectuer le contact (microbes-antiseptique) dans des godets largement ouverts à l'air libre, d'autant plus que la température de l'essai peut atteindre 20^o C. Ceci doit, tout au moins pour les substances les plus volatiles, entraîner une diminution de concentration des dilutions, pendant les 30 minutes nécessaires à l'essai.

A son tour, Hewlett ⁽¹³⁷⁾, en 1910, commenta les modifications apportées par la commission du *Lancet* au *Rideal Walker Test*. Il admit l'emploi du colibacille et de dilutions plus nombreuses, mais il critiqua l'usage de la cuiller de platine, du milieu à la bile, de la température variable, et du mode de calcul du coefficient.

D. — Modification du « Rideal Walker Test » proposée par l'« Hygienic Laboratory ».

En 1911, une autre modification fut proposée au *Rideal Walker Test*, par Anderson et Mc. Clintic ⁽⁵⁾. C'est cette modification qui devint plus tard la base de la *méthode de l'« Hygienic Laboratory »*, laquelle, très légèrement modifiée, fut reconnue officiellement en Amérique, en 1912, par un comité de l'« American Public Health Association ».

En voici les principales particularités :

1^o L'organisme témoin est de nouveau le bacille typhique considéré comme organisme plus régulier que le colibacille.

Une souche déterminée de bacille typhique est repiquée chaque jour en bouillon, durant une semaine, et les cultures successives sont placées à 37^o C. La dernière de ces cultures est utilisée pour l'essai. Les germes mis en expérience sont donc âgés de 24 heures.

2° On utilise pour les cultures et les subcultures un bouillon peptoné salé contenant : 0,3 p. 100 d'extrait Liebig ; 1 p. 100 de peptone ; 0,5 p. 100 de NaCl ;

3° La température de l'essai est fixée à 20° C., et sa constance est assurée à l'aide d'un thermostat ;

4° Pour l'essai de comparaison effectué avec le phénol, les auteurs emploient quatre dilutions au lieu d'une seule ;

5° Le coefficient phénol est calculé en prenant la moyenne des coefficients obtenus aux temps : 2 minutes et demie et 15 minutes.

— La proportion de culture microbienne ajoutée au désinfectant est abaissée à 0^{cc},1 pour 5 centimètres cubes de dilution désinfectante.

Après des temps de contact de 5, 7 et demie, 10, 12 et demie et 15 minutes, des prélèvements sont effectués et repiqués à l'aide d'une anse de platine en spirale, dans du bouillon peptoné salé. Les subcultures sont mises à incuber durant 48 heures à l'étuve à 37° C.

Nous donnons ci-dessous un exemple de détermination du phénol coefficient selon la technique de l' « Hygienic Laboratory ».

TABLEAU IV

DÉTERMINATION DU COEFFICIENT PHÉNOL DU DÉSINFECTANT « B »
Méthode de l' *Hygienic Laboratory*.

Température de l'essai, 20° C.; organisme témoin: bacille typhique,
âge de 24 heures, cultivé en bouillon.

Désinfectant et dilutions.	Temps d'exposition en minutes.					
	2 1/2	5	7 1/2	10	12 1/2	15
<i>Désinfectant « B » :</i>						
1/350	—	—	—	—	—	—
1/375	—	—	—	—	—	—
1/400	+	—	—	—	—	—
1/425	+	—	—	—	—	—
1/450	+	+	—	—	—	—
1/500	+	+	—	—	—	—
1/550	+	+	—	—	—	—
1/600	+	+	+	+	—	—
1/650	+	+	+	+	+	—
1/700	+	+	+	+	+	+
1/750	+	+	+	+	+	+
<i>Phénol :</i>						
1/80	—	—	—	—	—	—
1/90	+	—	—	—	—	—
1/100	+	+	+	—	—	—
1/110	+	+	+	+	+	—

— = Subculture négative.

— = Subculture positive.

Dans cet exemple, nous prenons, pour déterminer le coefficient phénol du désinfectant « B » :

1° La plus forte dilution du désinfectant capable de détruire les germes en 2 minutes et demie : 1/375 ;

2° La plus forte dilution du désinfectant capable de détruire les germes en 15 minutes : 1/650 ;

3° La plus forte dilution de phénol capable de tuer les germes en 2 minutes et demie : 1/80 ;

4° La plus forte dilution de phénol capable de tuer les germes en 15 minutes : 1/110.

Le coefficient phénol du désinfectant étudié est donc :

$$\frac{\left(\frac{375}{80} + \frac{650}{110}\right)}{2} = 5,3.$$

Mais les auteurs reconnurent rapidement que l'on ne pouvait donner à cette méthode un caractère tout à fait général. En 1921, ils procédèrent à une révision de la méthode. Ils précisèrent que l'essai devait être limité à la comparaison de corps chimiquement voisins du phénol et destinés à être utilisés contre le bacille typhique ou des germes de résistance voisine. Ils proposèrent une modification de la méthode. Elle comporte un essai en l'absence et en présence de matières organiques et une détermination des coefficients phénol sur des germes pathogènes autres que le bacille typhique, idée qui sera reprise ultérieurement par d'autres auteurs.

À la même époque furent encore effectuées quelques tentatives pour modifier le *Rideal Walker Test*.

Schneider⁽²⁶⁷⁾, en 1912, remarqua que, par la méthode du *Rideal Walker Test*, on négligeait complètement la mesure des propriétés antigénétiques, ce qui était, à son avis, certainement un tort. Par ailleurs, il fit remarquer que le bacille typhique était relativement peu résistant au phénol et il proposa de le remplacer non pas par le colibacille, comme l'avaient déjà fait certains auteurs, mais par le bacille pyocyanique.

Wright⁽³¹¹⁾ publia, en 1913, un essai comparatif de la méthode de Rideal et Walker et de celle de l'« Hygienic Laboratory ». Il essaya comparativement l'activité de divers désinfectants selon les deux méthodes, et constata que l'erreur expérimentale était moindre dans la méthode de l'« Hygienic Laboratory » que dans celle de Rideal et Walker. Il adopta donc la méthode de l'« Hygienic Laboratory », mais il proposa de modifier le mode de calcul du coefficient phénol utilisé par l'« Hygienic Laboratory » en adoptant celui qu'utilisaient Rideal et Walker.

D'autre part, pour des raisons identiques à celles données par la commission du *Lancet*, il préféra le colibacille au bacille typhique comme organisme témoin.

En 1920, Faustus et Florence Rumry⁽⁹⁷⁾ notèrent à leur tour la nécessité de modifier le *Rideal Walker Test*.

De son côté, Lockemann⁽¹⁸³⁾ (1925) apporta une proposition nouvelle dont l'idée avait, d'ailleurs, été entrevue par Novy⁽²⁰⁷⁾, en 1889.

Il conviendrait, d'après cet auteur, de diviser les désinfectants en plusieurs groupes, selon leurs caractères chimiques, et de choisir, pour

chacun de ces groupes, un représentant dont l'activité serait prise comme unité. D'autre part, l'organisme utilisé pour l'essai pourrait être, à volonté, selon les nécessités, un autre germe que le bacille typhique. De plus, l'essai devrait être effectué dans diverses conditions expérimentales, en utilisant des germes, soit maintenus en suspension, soit desséchés sur des fils de soie ou sur des morceaux d'étoffe ou des grenats. Enfin, pour se rapprocher des conditions pratiques, il serait utile d'effectuer un essai en présence de matières organiques ou d'impuretés. Le coefficient serait calculé pour les temps de 5 et de 60 minutes.

Cette proposition fut rejetée par la plupart des auteurs, comme étant trop complexe. La nécessité de choisir pour l'essai d'un désinfectant quelconque entre les divers groupes possibles de combinaisons (choix d'un antiseptique témoin, d'un microbe convenable, des conditions de l'essai) enlevait au procédé toute sa valeur comme essai standard.

Moore ⁽¹⁹⁷⁾, en 1926, proposa de mieux fixer les conditions de l'essai, en précisant le pH (7,6) du milieu nutritif utilisé pour la mesure du *Rideal Walker Test*.

Reddish ⁽²³⁷⁾, en 1925, après de très longs essais, reprit la suggestion faite en 1918 au comité réuni pour étudier la standardisation des désinfectants par « The Laboratory Section of the American Public Health Association » et proposa de déterminer le coefficient phénol sur des bactéries autres que le bacille typhique. Il choisit des germes représentant chacun un groupe d'agents pathogènes :

Le bacille typhique, pour représenter les bactéries à réaction de Gram négative, non sporulées ;

Le staphylocoque jaune, pour représenter les microbes du pus et les cocci à réaction de Gram positive ;

Le bacille diphtérique, pour représenter le groupe des bacilles granuleux à réaction de Gram positive et les formes diphtéroïdes ;

Le bacille de la tuberculose, représentant les germes acido-résistants ;

Le pneumocoque, représentant les cocci encapsulés à réaction de Gram positive ;

Le streptocoque hémolytique, représentant les germes pathogènes des septicémies, les agents de la scarlatine, de l'érysipèle, et les cocci en chaînettes à réaction de Gram positive.

Critiquant les méthodes proposées par Rideal et par l'« Hygienic Laboratory », Reddish en élimina les points jugés défectueux. Il proposa, en 1927, un nouveau procédé qui fut adopté par « The American Public Health Association », et que nous allons examiner maintenant, en décrivant d'abord l'essai type effectué avec le bacille typhique, puis les modifications apportées pour l'emploi des autres germes.

E. — Modification apportée par Reddish à la méthode de Rideal et Walker.

10 ESSAI EFFECTUÉ AVEC LE BACILLE TYPHIQUE COMME ORGANISME TÉMOIN. — Les conditions suivantes devaient être satisfaites :

a) La souche employée était repiquée, au moins une fois par mois, sur

du bouillon gélosé à 15 p. 1000, et conservée à la température du laboratoire. Puis elle était ensemencée dans le bouillon ci-dessous décrit, et repiquée journellement, pendant trois jours consécutifs, avant son utilisation.

La souche utilisée pour l'essai était une culture, sur bouillon, de bacille typhique, âgée de 22 à 26 heures, à 36°-38° C. D'après l'auteur, cette culture devait « être capable de résister à des dilutions de phénol comprises entre 1/90 et 1/100, pendant au moins 5 minutes à 20° C. Elle devait être tuée en 15 minutes par des dilutions croissantes de phénol allant jusqu'à 1/90 ».

b) Le milieu de culture utilisé avait la composition suivante :

Extrait de viande Liebig.....	0,5 p. 100
Peptone.....	1 —
Chlorure de sodium.....	0,5 —

Il était ajusté à pH 6,8.

c) La température de l'essai était de 20° C.

d) Le phénol utilisé pour l'essai de comparaison devait être conforme à celui de la Pharmacopée des États-Unis et son point de congélation ne devait pas être inférieur à 40° C. Une solution mère, à 5 p. 100 en poids, était préparée et titrée à l'eau de brome décinormale, puis conservée à l'abri de la lumière, dans de petits flacons jaunes bien bouchés.

e) La proportion de culture, non filtrée, ajoutée au désinfectant, était de 5/10 de centimètre cube pour un volume de 5 centimètres cubes de solution désinfectante.

f) L'anse de platine utilisée pour les ensemencements était une anse de 4 millimètres de diamètre.

g) L'incubation des subcultures avait lieu 48 heures, à 37° C.

h) Le temps d'action du désinfectant choisi pour le calcul du coefficient, temps qui doit suffire à la destruction des germes, était de 10 minutes. Rappelons qu'il était de 7 minutes et demie dans la méthode de Rideal et Walker, de 2 minutes et demie et 30 minutes dans la méthode du *Lancet*, et de 2 minutes et demie et 15 minutes dans celle de l'« Hygienic Laboratory ».

Marche de l'essai. — On prépare huit dilutions de l'antiseptique à étudier et deux dilutions de phénol, ces deux dernières étant aux concentrations de 1/90 et 1/100.

A intervalles de 30 secondes, on introduit, dans 5 centimètres cubes de chaque solution désinfectante, 0^{es},5 de culture microbienne, en prenant toutes les précautions d'usage pour ne pas contaminer le bord des tubes à essais.

Après 5, 10 et 15 minutes, on prélève un échantillon de chaque dilution, que l'on ensemence en bouillon standard, en respectant les intervalles de 30 secondes qui séparent chaque prélèvement.

Les dilutions du phénol et du désinfectant étudié sont donc essayées dans un même essai.

Les subcultures sont mises à incuber à 37° C., durant 48 heures.

Remarquons que, dans cette méthode, les échantillons sont prélevés, pour les subcultures, aux temps de 5, 10 et 15 minutes, c'est-à-dire trois fois en 15 minutes, alors que, dans les essais antérieurs, les prélèvements

étaient bien plus nombreux : dans le « Rideal Walker Test » et la méthode de l'« Hygienic Laboratory », ils s'effectuaient de 2 minutes et demie en 2 minutes et demie durant 15 minutes. Dans la méthode du *Lancet*, de 2 minutes et demie en 2 minutes et demie durant 30 minutes.

Le nombre plus restreint de prélèvements, préconisé par Reddish, avait évidemment pour but de simplifier l'essai effectué sur chaque germe, afin de pouvoir répéter facilement l'essai sur plusieurs espèces.

Le coefficient phénol du corps étudié était calculé en divisant la plus forte dilution du désinfectant capable de tuer le bacille typhique en 10 minutes par la dilution de phénol qui agissait de même. Pour apporter plus de précision à la méthode, le coefficient était calculé :

A 0,1 près, s'il était au-dessous de 1 ;

A 0,2 près, s'il était entre 1 et 5 ;

A 0,5 près, s'il était entre 5 et 10 ;

A 1,0 près, s'il était entre 10 et 20.

Le chiffre obtenu était appelé « coefficient phénol pour le bacille typhique ».

Nous donnons ci-dessous un exemple de détermination du coefficient phénol, selon la méthode de Reddish.

TABLEAU V

DÉTERMINATION DU COEFFICIENT PHÉNOL D'UN DÉSINFECTANT.
Méthode de Reddish.

Température de l'essai : 20° C. ; organisme témoin : bacille typhique, âgé de 24 heures, cultivé en bouillon.

Désinfectant et dilutions.	Temps d'exposition en minutes.		
	5	10	15
<i>Désinfectant :</i>			
1/300.....	—	—	—
1/350.....	+	—	—
1/400.....	+	+	+
1/450.....	+	+	+
<i>Phénol :</i>			
1/90.....	+	—	—
1/100.....	+	+	+

— = Subculture négative.

+ = Subculture positive

Dans l'exemple donné, nous prenons, pour calculer le coefficient phénol :

1° La plus forte dilution du désinfectant capable de tuer en 10 minutes l'organisme considéré : 1/350 ;

2° La plus forte dilution de phénol capable de produire le même effet : 1/90 ;

Le coefficient phénol est donc : $\frac{350}{90} = 3,89$.

2^o ESSAI EFFECTUÉ AVEC LE STAPHYLOCOQUE JAUNE COMME ORGANISME TÉMOIN. — Ce germe étant beaucoup plus résistant au phénol que le bacille typhique, il convient d'utiliser comme contrôle des dilutions de phénol de 1/70 et 1/60.

Par ailleurs, l'essai est le même que précédemment.

3^o ESSAI EFFECTUÉ AVEC LE BACILLE DIPHTÉRIQUE COMME ORGANISME TÉMOIN. — On repique successivement pendant trois jours une souche de bacille diphtérique sur sérum coagulé de Lœffler (préparé à partir de sérum déshydraté Difco). On prépare alors en sérum physiologique stérile une émulsion de la culture, de densité déterminée au néphélomètre.

Cinq dixièmes de centimètre cube de cette suspension sont soumis à l'action de 5 centimètres cubes de chacune des dilutions désinfectantes. Les prélèvements et repiquages sont effectués aux temps indiqués plus haut, pour l'essai avec le bacille typhique. Les subcultures sont effectuées en sérum coagulé. Pour ceci, on délaie d'abord le prélèvement dans le liquide de condensation du sérum coagulé incliné, puis on effectue à partir de ce liquide un deuxième repiquage sur un nouveau sérum coagulé. Ces repiquages successifs pour effectuer la subculture ont pour but de neutraliser l'action de la petite quantité de désinfectant entraînée en même temps que les germes.

Il faut noter que, dans cet essai, la suspension microbienne utilisée provient d'une émulsion des germes en eau physiologique, et non d'une culture en bouillon, comme dans les essais précédents. Les conditions de ces divers essais ne sont donc pas rigoureusement comparables.

Les deux dilutions de phénol utilisées comme contrôle sont faites aux dilutions de 1/100 et 1/120.

Le bacille diphtérique utilisé pour l'essai doit être suffisamment résistant pour ne pas être détruit en 5 minutes par la dilution au 1/100, ni en 15 minutes par celle au 1/120.

4^o ESSAI EFFECTUÉ AVEC LE BACILLE DE LA TUBERCULOSE COMME ORGANISME TÉMOIN. — Cet essai est effectué par inoculation, à des cobayes, de crachats tuberculeux homogénéisés additionnés de quantités diverses de désinfectant. Les animaux survivants sont autopsiés après 64 jours, et les résultats positifs sont basés sur des modifications pathologiques importantes.

5^o ESSAI EFFECTUÉ AVEC LE PNEUMOCOQUE OU LE STREPTOCOQUE HÉMOLYTIQUE COMME ORGANISMES TÉMOINS. — Cet essai est identique dans les deux cas, car ces deux organismes exigent des conditions vitales optima semblables. Avant l'essai, la culture souche de chacun de ces organismes est repiquée en bouillon glucosé à 1 p. 100, et celle-ci est laissée 24 heures à 37° C.

On ensemence alors 0^{cc},4 de cette culture dans 10 centimètres cubes du bouillon standard habituel sans glucose, et on place ce bouillon à 37° C. pendant 24 heures. A l'aide d'une anse de platine de 4 millimètres de diamètre, on effectue un repiquage dans un autre tube de bouillon standard sans glucose, et l'essai est poursuivi comme pour le

bacille typhique. Les subcultures sont effectuées dans du bouillon glucosé et maintenues 48 heures à 37° C.

Les souches de pneumocoque utilisées doivent être telles qu'elles ne soient pas tuées en 5 minutes par la dilution de phénol à 1/100, ni en 15 minutes par la dilution de phénol au 1/120. Les souches de streptocoque utilisées pour l'essai ne doivent pas être tuées en 5 minutes par la dilution de phénol à 1/90, ni en 15 minutes par la dilution à 1/110.

Les essais ci-dessus décrits, proposés par Reddish, sont réservés à l'appréciation de la valeur antibiotique des désinfectants chimiques.

L'auteur décrit également des techniques d'essai pour diverses préparations utilisées comme désinfectants, telles que des huiles, poudres, pâtes dentifrices, crèmes et savons antiseptiques.

Il proposa pour l'essai de ces substances la méthode dite « du papier filtre », qui est une variante de la méthode des porte-germes. Nous avons donné déjà quelques indications à son sujet.

Malgré les précisions qu'elle apportait, la méthode de Reddish n'eut pas le succès qu'on pouvait espérer. On lui reprocha de ne pas donner des résultats réguliers. Ainsi, en 1931, Abbott Allen et Wright ⁽²⁾ proposèrent de compléter les renseignements, obtenus avec la méthode de Reddish, en déterminant le pouvoir antibiotique de la substance en présence d'une infection massive, et en déterminant aussi son pouvoir de pénétration dans un milieu solidifié. Nous examinerons plus loin, en détail, les techniques proposées par ces auteurs.

La même année (1931), les Américains Georges Léonard et Edna Heacok ⁽¹⁷⁸⁾, utilisant la méthode proposée par Reddish, pour l'essai de nombreux désinfectants, ne purent obtenir des résultats d'une régularité suffisante. Ils revinrent donc à la méthode d'essai de l'« Hygienic Laboratory », mais ils la complétèrent en effectuant un deuxième essai sur un autre type d'organisme : le staphylocoque doré, et ils proposèrent quelques autres modifications.

F. — Modifications du « Rideal Walker Test » proposées par G. Léonard et E. Heacok.

a) Les cultures à utiliser pour l'essai sont, trois jours avant l'essai, transportées en bouillon à l'extrait de bœuf, puis repiquées journellement dans ce même milieu. (On a vu plus haut que, dans la méthode de l'« Hygienic Laboratory », ces repiquages successifs avaient lieu durant une semaine.) La culture utilisée pour l'essai lui-même est une culture en bouillon âgée de 24 heures.

b) La marche de l'essai est exactement la même, dans le cas du bacille typhique, que dans la méthode de l'« Hygienic Laboratory ». Mais, pour l'essai avec le staphylocoque doré, les temps auxquels sont effectués les prélèvements sont différents. Alors que ces temps sont, pour l'essai avec le bacille typhique : 5, 7 et demie, 10, 12 et demie et 15 minutes, ils sont, dans l'essai avec le staphylocoque jaune : 1, 5, 10 et 15 minutes.

Le coefficient phénol du corps étudié est calculé d'après la moyenne de trois rapports. Ceux-ci sont obtenus en divisant les plus fortes dilu-

tions du désinfectant capables de tuer respectivement les germes en 5, 10 et 15 minutes, par les dilutions phénoliques capables de produire les mêmes effets.

Toutes les autres conditions de l'essai sont exactement les mêmes que celles de la méthode de l'« Hygienic Laboratory ».

Nous donnons ci-dessous un exemple de détermination du coefficient phénol d'un désinfectant, selon la technique de Léonard et Heacok. Il s'agit ici d'une détermination du coefficient phénol vis-à-vis du bacille typhique.

TABLEAU VI

DÉTERMINATION DU COEFFICIENT PHÉNOL D'UN DÉSINFECTANT
Méthode de Léonard et Heacok.

Température de l'essai: 20° C.; organisme témoin: bacille typhique
âgé de 24 heures, cultivé en bouillon.

Désinfectant et dilutions.	Temps d'exposition en minutes.				
	5	7 1/2	10	12 1/2	15
1/500	—	—	—	—	
1/550	+	—	—	—	—
1/600	+	+	—		
1/650	+	+	+		
1/700	+	+	+	+	—
1/750	+	+	+		
<i>Phénol:</i>					
1/80	—				
1/90	—				
1/100	+	+	—	—	—
1/110	+	+	+	+	

— = Subculture négative.

+ = Subculture positive.

Dans cet exemple, pour calculer le coefficient phénol du désinfectant, nous prenons donc :

1° La plus forte dilution du désinfectant capable de tuer les germes en 5 minutes : 1/500 ;

2° La plus forte dilution de phénol capable de tuer les germes en 5 minutes : 1/90.

Nous faisons le rapport des deux dénominateurs de ces dilutions : $\frac{500}{90}$.

3° La plus forte dilution du désinfectant capable de tuer les germes en 10 minutes : 1/600 ;

4° La plus forte dilution de phénol capable de tuer les germes en 10 minutes : 1/100.

Nous établissons le rapport : $\frac{600}{100}$.

5° La plus forte dilution du désinfectant capable de tuer les germes en 15 minutes : 1/700 ;

6° La plus forte dilution de phénol capable de tuer les germes en 15 minutes : 1/100.

Nous établissons le rapport : $\frac{700}{100}$.

La moyenne arithmétique des trois rapports obtenus nous donne : $\frac{500}{90} + \frac{600}{100} + \frac{700}{100} = \frac{(5,55 + 6 + 7)}{3} = 6,18$, comme coefficient phénol.

D'après les auteurs, cette technique donnerait entière satisfaction. Au cours de leurs essais, les coefficients déterminés sur les deux organismes se sont généralement montrés identiques. Les auteurs ont, de plus, signalé le fait que, durant 8 années, les souches microbiennes utilisées ont présenté une résistance absolument constante à l'action du phénol.

Cependant, dans une publication plus récente, Georges Léonard⁽¹⁷⁷⁾ a exposé les difficultés qu'il rencontra ultérieurement dans l'application de cette technique à l'étude de certaines préparations désinfectantes. Il s'agissait de préparations à base d'argent qui étaient douées de propriétés antigénétiques très accentuées, de sorte que les quantités transportées dans la subculture suffisaient à gêner le développement des germes dans ce nouveau milieu. Les résultats observés étaient donc sujets à de lourdes erreurs. Ils étaient, de plus, très irréguliers.

Pour savoir si l'absence de poussée constatée dans une subculture était due au fait cherché, c'est-à-dire à la destruction complète des germes, par l'antiseptique, ou bien si ce phénomène était dû à l'influence nocive exercée sur les bactéries repiquées par la petite quantité de substance entraînée, l'auteur proposa la technique suivante :

Il repiquait dans des tubes de bouillon neuf une anse de chacun des bouillons de subculture, un quart d'heure après leur ensemencement. La nouvelle dilution ainsi apportée au désinfectant entraîné pouvait permettre le développement des germes restés vivants, germes qui pouvaient ne pas se développer dans la première subculture. Cette technique supplémentaire, que l'auteur désigna sous le nom d' « Essai transfert », permettait de savoir si l'essai normal était valable, en comparant les résultats des deux subcultures successives.

Il nota également que l'on pouvait aussi atténuer l'action antigénétique de la petite quantité d'antiseptique transportée dans la subculture, en repiquant l'échantillon prélevé pour cette subculture dans un volume relativement grand de milieu nutritif. On pouvait, par exemple, employer 40 centimètres cubes de bouillon, au lieu des 10 centimètres cubes généralement employés. Mais l'auteur reconnut lui-même que ce

TABLeAU VII. — PRINCIPALES TECHNIQUES UTILISÉES POUR LA DÉTERMINATION DU COEFFICIENT PHÉNOL.

Principe : Chercher la plus faible concentration de l'antiseptique étudié, capable de détruire définitivement des germes, en faisant varier la dilution de l'antiseptique et les temps d'action sur les germes. — Chercher la plus faible concentration de phénol produisant la même action dans les mêmes conditions. — Faire le rapport de ces deux concentrations. Le nombre obtenu représente le « coefficient phénol » de l'antiseptique étudié.

	Méthode de Rideal et Walker admise officiel ¹ en Angleterre, 1903.	Méthode du Lancel 1909.	Méthode de l'Hygienic Laboratory ² , 1912.	Modification proposée par Reddish, 1927.
<i>Micro-organisme utilisé, . . .</i>				
A. — Préparation des germes utilisés pour l'essai	Bacille typhique. Culture de 24 heures à 37°, en bouillon à l'extrait Liebig. Agiter avant l'essai, pour répartir les germes, et filtrer sur papier.	Colibacille. Culture de 24 heures à 37°, en bouillon. Agiter avant l'essai pour répartir les germes et filtrer sur papier.	Bacille typhique. Souche conservée sur gélose à la température du laboratoire et repiquée toutes les 24 heures en bouillon à l'extrait Liebig pendant les 2 jours qui précèdent l'essai.	Essai particulier pour chacune des espèces bactériennes mises en expérience. <i>Essai avec le bacille typhique.</i> Souche conservée sur gélose à la température du laboratoire et repiquée toutes les 24 heures en bouillon à l'extrait Liebig, pendant les 8 jours qui précèdent l'essai. Résistance au phénol vérifiée avant chaque essai. Culture de 22 à 26 heures, à 36°-38°, en bouillon à l'extrait Liebig. Agiter avant l'essai.
B. — Conditions de l'essai. . .	V gouttes de bouillon de culture dans 5 centimètres cubes de chaque solution aqueuse du désinfectant.	V gouttes de bouillon de culture dans 5 centimètres cubes de chaque solution aqueuse du désinfectant.	Culture de 24 heures en bouillon à l'extrait Liebig. Agiter avant l'essai. Filtrer sur papier. Maintenir au bain-marie à 20° C.	0 ^{cc} ,50 de bouillon de culture dans 5 centimètres cubes de chaque solution aqueuse du désinfectant.
Milieu de contact entre le désinfectant et les germes.				
Quantité de culture microbienne en expérience.				

Temps maximum d'action du désinfectant.....	15 minutes.	30 minutes.	15 minutes.	15 minutes.
Nombre de prélèvements effectués pour chaque dilution, pendant la durée d'une expérience.....	6	9	6	3
Intervalle de temps entre chaque prélèvement	2 minutes et demie.	2 minutes et demie dans les 15 premières minutes, et 5 minutes dans les 15 dernières.	2 minutes et demie.	5 minutes.
Température de l'essai....	15 à 18° C.	18° à 20° C.	20° C.	20° C.
C. — <i>Vérification de l'action antibiotique.</i>				
Milieu utilisé pour la subculture.....	Bouillon à l'extrait Liebig.	Bouillon aux sels biliaires.	Bouillon à l'extrait Liebig.	Bouillon à l'extrait Liebig.
Quantité du mélange (suspension de germes-désinfectant) transportée dans la subculture.....	Une anse de platine de 2 millimètres de diamètre pour 5 centimètres cubes de bouillon.	Une cuillère de platine d'une capacité de 0 ^{cc} 08, pour 5 centimètres cubes de bouillon aux sels biliaires.	Une anse de platine de 4 millimètres de diamètre pour 5 centimètres cubes de bouillon.	Une anse de platine de 4 millimètres de diamètre pour 5 centimètres cubes de bouillon.
Temps d'incubation des subcultures	48 heures à 37°.	48 heures à 37°.	48 heures à 37°.	48 heures à 37°.
D. — <i>Calcul du coefficient phénol</i>	Rapport des plus fortes dilutions des deux antiseptiques qui tuent les germes en 7 minutes et demie.	Rapport des plus fortes dilutions des 2 antiseptiques qui tuent les germes en 2 minutes et demie et en 30 minutes. Moyenne des deux résultats.	Rapport des plus fortes dilutions des deux antiseptiques qui tuent les germes en 2 minutes et demie et en 15 minutes, moyenne des deux résultats.	Rapport des plus fortes dilutions des deux antiseptiques qui tuent les germes en 10 minutes.

procédé n'était guère recommandable pratiquement, en raison de l'énorme quantité de milieux de culture que nécessiteraient ainsi des essais effectués en série.

G. Léonard admit, d'ailleurs, que la détermination du « phénol coefficient », d'après la technique de l' « Hygienic Laboratory », devait être réservée uniquement aux corps chimiquement apparentés au phénol et doués de propriétés antigénétiques peu prononcées. C'est bien là la limite précisée par la Commission de révision de la méthode de l' « Hygienic Laboratory », en 1921.

Quant aux corps fortement antigénétiques, l'auteur proposa, pour leur essai, la détermination de cette valeur antigénétique, et il donna à ce sujet la technique du « Growth restraining test », que nous avons examinée au sujet des méthodes d'essai du pouvoir antigénétique.

Pour faciliter la comparaison des diverses méthodes du coefficient phénol que nous venons d'examiner, nous donnons ci-dessus un tableau récapitulatif où sont indiqués les principaux points de ces techniques (tableau VII).

Discussion de la valeur des méthodes de détermination du « coefficient phénol ».

La méthode du « coefficient phénol » a déjà été discutée par un certain nombre d'auteurs, qui ont chacun proposé quelque modification aux méthodes précédemment décrites. [Czaplewski ⁽⁶⁵⁾ (1912), Duyser et Lewis ⁽⁸⁵⁾ (1914), Hamilton et Tatsuzo Ohno ⁽¹²⁹⁾ (1917), Bujwid ⁽³⁹⁾ (1918).] Vers 1922, plusieurs auteurs allemands, Pülke, Grempe ⁽¹¹⁸⁾, Croner ⁽⁶⁰⁾, Klimmer ⁽¹⁵⁹⁾ et Bokorny ⁽³¹⁾, et, tout récemment, les auteurs anglo-saxons eux-mêmes, Nyiri ⁽²⁰⁸⁾, Shippen ⁽²⁷⁸⁾, Coulthard ⁽⁵⁹⁾ (1928) ont insisté sur la nécessité d'apporter des modifications à ce mode d'essai des désinfectants. A notre tour, nous allons l'examiner de plus près, en nous aidant des résultats apportés par nos essais personnels qui seront développés plus longuement dans le deuxième chapitre.

L'idée de comparer l'activité inconnue de désinfectants nouveaux à l'activité connue d'une substance choisie comme étalon a été vraisemblablement conçue pour des fins pratiques. D'une part, elle correspondrait aux habitudes commerciales qui donnent à un produit une valeur marchande proportionnelle à son efficacité relative par rapport à un produit commercialement connu. D'autre part, elle permettrait *a priori* de négliger une partie des nombreuses causes d'erreur expérimentales qui viennent entraver l'exacte détermination des valeurs antiseptiques.

Ainsi, à un moment où la plupart des antiseptiques employés en Angleterre appartenaient au groupe chimique du phénol, il était logique d'exprimer la valeur des désinfectants nouveaux par rapport à celle de ce corps d'activité bien connue. De même, pour des bactériologistes consciencieux, il était tentant d'essayer d'éliminer certains facteurs de variabilité, en effectuant simultanément, dans les mêmes conditions, l'essai du corps à l'étude et une expérience témoin avec le désinfectant choisi comme étalon.

L'ESSAI COMPARATIF, EFFECTUÉ AVEC LE PHÉNOL, A-T-IL APPORTÉ LES GARANTIES ATTENDUES ? — Notons, tout d'abord, que la détermination des « coefficients phénol » ne nous semble pas d'un grand secours pour établir la *valeur marchande* des désinfectants. Il est évident, en effet, que la valeur commerciale d'un produit est beaucoup moins fonction, financièrement parlant, de son activité que des conditions économiques qui permettent de l'obtenir. Il nous paraît facile de trouver, dans l'arsenal médicamenteux, des produits d'heureuse inspiration, qui possèdent à la fois une activité notablement plus grande et un prix de revient notablement plus bas que les substances analogues, les premières connues, choisies comme termes de comparaison.

Voyons maintenant si les auteurs anglais ont réussi à éliminer, par une mesure comparative, les *facteurs de variabilité de l'essai*, et s'ils ont ainsi réussi à améliorer les résultats antérieurement acquis. Pour résoudre cette question, il nous faut pénétrer un peu plus avant dans l'intimité des phénomènes de la désinfection.

Comme nous l'avons noté, toute opération désinfectante comporte un certain nombre de termes :

1^o L'*antiseptique*, c'est-à-dire la substance chimique elle-même ;

2^o Le *milieu* où se fait le contact entre l'antiseptique et les germes (constitué par le liquide de suspension des germes et par la solution de la substance antiseptique), présentant un certain nombre de variables particulières (solvant choisi, concentration de la solution, température du milieu, etc...) ;

3^o Le *microbe* que nous pouvons définir dans sa *quantité* (nombre de germes par unité de volume de suspension) et dans sa *qualité* (espèce microbienne, race, moment de l'évolution microbienne, vitalité, présence ou absence de spores, etc...).

Enfin, nous devons faire intervenir un quatrième terme qui est la *durée de l'action* désinfectante, c'est-à-dire le temps durant lequel l'antiseptique et les germes sont laissés en contact, et un cinquième terme : la *température* à laquelle est effectué l'essai.

Il est évident que le premier terme ne peut qu'être bien défini. Il ne saurait être vraiment utile de mesurer l'action antiseptique de corps de composition inconstante et susceptibles d'une variation non prévisible. Les trois autres termes de la réaction vont, par contre, nous fournir l'origine des causes d'erreur que l'on doit essayer d'éliminer.

Des erreurs peuvent tout d'abord provenir d'une précision insuffisante dans la définition ou dans la mesure du quatrième terme : la *durée d'action*. Elles peuvent provenir également de variations dans la *température* de l'essai. Enfin elles proviendront surtout de variations dans la qualité et dans la quantité des germes utilisés.

Ce sont, à notre avis, les principaux points sur lesquels on a pu espérer apporter quelque amélioration en effectuant un essai comparatif avec le phénol. Voyons, en examinant successivement chacun de ces facteurs variables, si le but proposé a été atteint.

Facteur température. — Pour situer le problème de façon plus précise, voyons si une variation concernant la température de l'essai du corps étudié est contrebalancée par une variation équivalente produite

dans l'essai témoin sur le phénol. En d'autres termes, peut-on se permettre, grâce à l'essai comparatif, d'agir à n'importe quelle température (celle-ci devant évidemment rester dans des limites compatibles avec l'essai), pourvu que cette température soit la même dans les deux essais ? Le coefficient phénol cherché sera-t-il indépendant de cette variation de température ? Nous ne le pensons pas.

Sans insister ici sur des essais qui trouveront leur place au chapitre suivant, nous pouvons dire que les variations de température agissent généralement à un degré différent sur l'activité de deux désinfectants différents. Ceci ressort nettement d'essais que nous avons effectués sur l'iode, le bichlorure de mercure et le phénol, et concorde avec des résultats antérieurs apportés par divers auteurs [Miss Chick ⁽⁴⁸⁾ (1908), Cooper et Haines ⁽⁵⁶⁾ (1928)]. Il en résulte que le coefficient phénol n'est pas indépendant de la température à laquelle il est déterminé. Il nous faut cependant reconnaître que, dans les méthodes du « coefficient phénol », ces variations de température sont relativement restreintes, puisque la marge de température admise par les auteurs anglo-saxons pour leurs essais ne dépasse pas 2° C.

Facteur temps de contact. — Une variation dans le temps de contact entre l'antiseptique et les germes influence-t-elle au même degré l'activité de deux antiseptiques différents ? Le coefficient phénol est-il indépendant du temps de contact entre l'antiseptique et les germes ? Nous ne le pensons pas. En effet, comme nous le verrons plus loin, il y a des désinfectants qui agissent rapidement et d'autres qui exigent un temps d'action nettement plus long. L'activité de ces différents corps est donc influencée très différemment par des variations dans le temps de leur action. Ceci ressort très nettement des essais de différents auteurs [Miss Chick-Clarck ⁽⁵³⁾], et d'essais personnels que nous décrirons plus loin en détail. La valeur obtenue pour un « coefficient phénol » peut donc être très différente selon que le temps d'action des désinfectants, choisi pour l'essai, est plus ou moins long.

C'est pour cette raison que certains auteurs, comme Woodhead et Ponder ⁽³¹⁰⁾, ont proposé de prendre la moyenne de deux coefficients phénol obtenus l'un en un temps court, et l'autre en un temps long. Mais il ne nous semble pas que ce procédé assure la neutralisation des erreurs dues aux variations dans le temps d'action.

Rappelons à ce sujet que, dans la méthode de Rideal et Walker, on cherche la dose d'antiseptique, qui, incapable de stériliser le milieu en 5 minutes, peut arriver à ce résultat en 7 minutes et demie. Nous avons donc là, même en n'admettant aucune erreur expérimentale, une variation autorisée de 2 minutes et demie, sur 7 minutes et demie, soit d'un tiers au total, ce qui n'est aucunement justifiable.

Mais les deux variables que nous venons d'examiner, température et durée d'action, ne nous semblent pas constituer les causes d'erreur primordiales dans la mesure de l'activité désinfectante. Il nous semble que les auteurs, en instituant l'essai comparatif avec le phénol, ont eu tout particulièrement en vue de remédier aux variations inévitables du facteur microbien.

Facteur microbien. — Comme nous l'avons déjà noté, les germes utilisés pour l'essai peuvent varier en *quantité* et aussi en *qualité*.

En ce qui concerne la *quantité des germes*, les auteurs, malgré la précision et le soin qu'ils ont apportés à la mise au point de leurs méthodes, n'ont pas cherché à évaluer le nombre des germes qu'ils mettaient en expérience. Sans essayer d'apporter sur ce point aucune amélioration réelle aux techniques préconisées par leurs devanciers, ils se sont contentés de fixer, dans la mesure du possible (à l'aide de gouttes de pipettes standard, d'anses de platine ou de cuillerons de platine jaugés), les volumes des suspensions microbiennes employés. Ils jugeaient donc suffisant d'assurer l'égalité des volumes d'une même suspension microbienne entrant en jeu dans chacun des deux essais comparatifs.

Une variation dans le nombre de germes soumis à l'action de l'antiseptique a-t-elle une même influence, quel que soit l'antiseptique considéré ? Le coefficient phénol est-il indépendant des variations dans la densité des émulsions microbiennes ? Nous ne le pensons pas.

Nous verrons plus loin qu'un très grand nombre d'auteurs se sont occupés de l'influence exercée sur les résultats de la désinfection par le nombre des germes mis en jeu. [Von Behring (1890), Boer ⁽³⁰⁾, Geppert ⁽¹¹²⁾ (1891), Grüber ⁽¹¹⁹⁾ (1892), Paul et Krönig ⁽¹⁶⁴⁾ (1897), Ficker ⁽⁹⁸⁾ (1898), von Lingsheim ⁽¹⁸⁰⁾ et Eijkmann, Miss Chick et Martin ⁽⁵⁰⁾ (1908), Dengler ⁽⁷⁸⁾, Hailer ⁽¹²⁶⁾, Reichenbach, B. Lange ⁽¹⁷¹⁾, M. Hahn ⁽¹²⁵⁾, Göbel ⁽¹¹⁵⁾, Behrens ⁽¹⁵⁾, Kückel ⁽¹⁴⁵⁾, Liese et Mendel ⁽¹⁷⁹⁾, etc...]

Nous verrons, également, que nos essais personnels (effectués sur le phénol, le bichlorure de mercure et l'iode) nous ont permis de constater que l'influence exercée sur les résultats de l'essai par le nombre de germes en expérience variait beaucoup selon la substance désinfectante considérée.

Le coefficient phénol d'une substance n'est donc pas indépendant du nombre des germes en expérience, puisque celui-ci n'influence pas nécessairement d'une façon parallèle l'activité de la substance à l'étude et celle du phénol. Il importe donc de fixer avec précision ce nombre et de l'évaluer en unités moins vagues que des « gouttes de culture en bouillon ».

Examinons maintenant l'effet des variations possibles dans la *qualité des germes* utilisés pour l'essai. Voyons si ces variations de qualité, et particulièrement de vitalité des germes à l'essai, influencent au même degré l'essai effectué avec le désinfectant à l'étude et l'essai effectué avec le phénol. Le coefficient phénol est-il indépendant de ces variations ? Nous ne le pensons pas.

En effet, des essais effectués en vue de déterminer l'influence sur l'essai de désinfection de l'âge des germes en expérience (essais que nous décrirons au chapitre suivant) nous ont permis de constater que cette influence se faisait sentir d'une façon très différente selon les désinfectants considérés. Ainsi, au cours d'essais de désinfection sur le staphylocoque doré, nous avons constaté que la résistance au sublimé était sensiblement identique pour des germes âgés de 5 heures et des germes âgés de 24 heures (tous cultivés en macération de viande). La résistance à l'iode était nettement plus grande pour les germes âgés de 5 heures que pour les germes âgés de 24 heures, et la résistance au phénol était,

au contraire, un peu plus grande pour les germes âgés de 24 heures que pour les germes âgés de 5 heures.

Il semble donc qu'à ce point de vue également l'essai avec le phénol n'apporte qu'une fausse garantie aux variations éventuelles de vitalité des germes, puisque l'influence de ces variations peut être exactement opposée vis-à-vis du phénol et de la substance à l'étude.

Cependant les auteurs anglo-saxons ont entrevu très nettement l'importance de ce facteur, et ils ont eu le grand mérite de chercher, en quelque sorte, à stabiliser leurs souches. Ils se sont astreints à effectuer des repiquages à heures fixes sur des milieux donnés, dans des conditions définies, et à utiliser pour l'essai des germes prélevés à une heure donnée de leur développement. Il convient également de citer les essais d'appréciation de la vitalité, préconisés par Reddish, qui proposa de n'utiliser pour l'essai que des souches capables de résister pendant un temps donné à une solution de phénol de concentration donnée.

Il est, enfin, un dernier point, relatif à l'organisme microbien, auquel les auteurs anglo-saxons semblent n'avoir pas attribué une importance suffisante : c'est le *milieu dans lequel les germes sont mis en suspension pour l'essai*. Ces auteurs, cherchant avant tout à simplifier les manipulations, utilisent, de préférence, directement, comme milieu de suspension des germes, le bouillon de culture dans lequel ils se sont développés. Ils introduisent donc ainsi, dans le milieu d'essai, une quantité de substances organiques et salines indéfinie, qui, si petite soit-elle, suffit à modifier, dans des rapports très variables, l'activité des diverses substances essayées. Nous examinerons plus loin en détail l'importance de ce facteur.

De tout ce qui précède, nous pouvons conclure que le but poursuivi par les auteurs anglo-saxons, à savoir la neutralisation des variations expérimentales par la conduite de deux essais effectués simultanément, dans les mêmes conditions, ne nous semble pas avoir été atteint. En résumé, la raison primordiale de cet insuccès réside dans le fait que *les deux réactions comparées sont influencées à des degrés très différents par les diverses conditions expérimentales*. Ce fait est d'autant plus accentué que le phénol, choisi comme terme de comparaison, est, comme nous le verrons plus loin, assez particulier, en ce sens qu'il est beaucoup moins sensible que les autres antiseptiques aux diverses variations expérimentales de l'essai de désinfection, ce qui est loin d'apporter un avantage à l'essai comparatif.

D'ailleurs, en supposant que l'expérience ait justifié les hypothèses posées à la base des méthodes des coefficients phénol, nous ne pensons pas que cette méthode ait pu avoir, même dans ce cas, une valeur générale. En effet, les résultats qu'elle apporte ne sont valables que pour l'espèce microbienne envisagée dans l'essai, car les diverses espèces microbiennes réagissent de façon tout à fait différente vis-à-vis d'un même antiseptique.

Cette différence de comportement n'existe pas seulement entre des germes de constitution totalement différente, ou entre des espèces différant par leur mode de vie ou de reproduction, mais elle est également

sensible pour des espèces très voisines que l'on a coutume de classer dans un même groupe bactérien. C'est ainsi que le phénol, antiseptique choisi comme terme de comparaison, exerce une action beaucoup plus marquée sur le bacille typhique que sur le colibacille par exemple. A plus forte raison, agit-il de façon différente sur d'autres germes tels que les cocci pyogènes, le bacille diphtérique, ou le bacille de la tuberculose.

Ce fait a d'ailleurs été noté par un certain nombre d'auteurs (Lockemann, Reddish) qui ont proposé d'effectuer non plus un seul essai sur une seule espèce bactérienne, mais plusieurs essais sur divers germes représentant les divers groupes bactériens. C'est cette proposition que nous avons examinée lorsque nous avons décrit la modification apportée par Reddish au *Rideal Walker Test*. Remarquons que cette proposition, si elle donne à la méthode du coefficient phénol une valeur générale beaucoup plus grande, ne suffit cependant pas à éliminer complètement l'objection en cause, puisque les divers membres d'une même famille bactérienne présentent entre eux des différences de résistance parfois très marquées.

Il nous reste enfin à porter contre la méthode des coefficients phénol une objection des plus importante : il est curieux de constater que les auteurs qui ont mis au point, avec tant de précision, ces techniques, n'ont pas porté leur attention sur une cause d'erreur cependant évidente. La petite quantité de substance antiseptique transportée, en même temps que les germes, dans le milieu de subculture, peut nuire à la multiplication des bactéries restées vivantes. Rappelons que cette cause d'erreur avait été entrevue dès les premiers travaux, par les auteurs allemands, et notamment par R. Koch qui avait créé, pour l'éliminer, la « méthode des fils ».

Or, ce facteur de trouble intervient d'autant plus, dans les techniques des coefficients phénol, que les corps phénoliques, s'ils sont peu antigénétiques, comme le pensaient les auteurs anglo-saxons, sont encore bien moins antibiotiques, et qu'elles nous obligent, de ce fait, à transporter dans les subcultures des quantités relativement grandes de substance antiseptique. Dans ce cas particulier, l'essai contrôle, loin d'atténuer l'erreur possible, ne peut donc que l'accentuer. C'est là, à notre avis, la plus grave objection qui puisse être élevée contre la méthode du coefficient phénol.

Enfin, pour terminer, nous devons apporter à la méthode une critique de technique, une de ces critiques qui ont paru si importantes aux auteurs anglo-saxons, et qui ne seraient, pour nous, que des critiques de détail, si nous avions pu vérifier le bien-fondé des hypothèses qui sont à la base même de la méthode. Il nous semble peu compréhensible d'effectuer dans le mélange (désinfectant-suspension microbienne) des prélèvements étagés sur des temps différents (2 et demie, 5, 7 et demie, 10, 12 et demie, 15 minutes, etc...), et de calculer systématiquement les résultats de l'essai pour un seul de ces temps (7 minutes par exemple). Nous ne comprenons pas bien la nécessité d'un essai aussi long et dispendieux, et nous jugeons préférable de ne conserver qu'une variable. Nous verrons plus loin pour quelle raison nous estimons que la variable à adopter est la concentration de la substance antiseptique.

Quoi qu'il en soit, si nous portons une vue d'ensemble sur les objections que nous venons de porter contre les méthodes du coefficient phénol, nous pouvons dire que :

1^o Cette technique est longue et dispendieuse et oblige à effectuer des opérations dont l'utilité ne se conçoit pas très bien ;

2^o Les causes d'erreur qu'elle a prétendu atténuer ou éviter subsistent presque intégralement ;

3^o En tout état de cause, elle ne saurait avoir une valeur générale, les résultats qu'elle apporte n'étant valables que pour le germe considéré dans l'essai ;

4^o Enfin, et surtout, elle est passible d'une des plus vieilles et des plus importantes critiques que l'on puisse faire aux méthodes de détermination des valeurs antiseptiques, à savoir qu'en déterminant la valeur antibiotique la méthode ne tient aucun compte du pouvoir antigénétique des corps qu'elle essaye.

Pour toutes ces raisons, il ne nous a donc pas semblé possible d'adopter pour nos essais l'une ou l'autre de ces techniques du coefficient phénol, même en modifiant les points jugés défectueux, puisque leur principe même ne nous semble pas justifiable.

II. — MÉTHODES DES SUSPENSIONS SANS ESSAI COMPARATIF

Après avoir successivement étudié les méthodes les plus importantes préconisées pour la mesure des valeurs antiseptiques : celles de R. Koch et de ses collaborateurs, et les méthodes classiques des « coefficients phénol », nous allons examiner rapidement quelques autres méthodes qui sont, du reste, loin de présenter le même intérêt.

Voyons tout d'abord celles qui utilisent aussi des suspensions microbiennes. La plupart ont été mises au point pour des buts spéciaux et ne prétendent pas à une valeur générale ; nous nous contenterons d'en citer quelques-unes.

Guéguen (¹²⁰), en 1908, outre sa méthode de détermination du pouvoir antigénétique, que nous avons déjà examinée, a proposé une méthode de détermination simultanée du pouvoir antibiotique qu'il désignait sous le nom de « pouvoir toxique ». Pour cela, il effectuait la détermination du pouvoir antigénétique en ensemençant les germes sur des milieux gélatinés, préalablement additionnés de quantités variables de substances antiseptiques. Puis, ayant noté, au bout d'une dizaine de jours, quels tubes étaient restés stériles, il ajoutait dans ces tubes quelques centimètres cubes de bouillon nutritif, afin de se rendre compte s'il y avait eu non seulement arrêt du développement, mais encore destruction définitive des germes ensemencés. Connaissant la dose de la substance antiseptique contenue dans les tubes où aucune culture ne s'était produite, même dans le bouillon nutritif ajouté, il pouvait facilement calculer la dose antibiotique de la substance considérée.

Cet essai avait le mérite d'être rapide. Il était cependant passible de deux reproches :

D'une part, le bouillon gélatiné, additionné d'antiseptique, puis solidifié, n'offre qu'un contact imparfait avec les germes ensemencés. D'autre part, lors de la mesure du pouvoir antibiotique, la substance antiseptique enclose dans la gélatine peut fort bien, surtout à la température relativement élevée de l'étuve, passer dans le bouillon et venir gêner la multiplication des germes restés vivants. Guéguen fit d'ailleurs lui-même la première de ces remarques, et il proposa, comme nous l'avons vu pour la mesure du pouvoir antigénétique, d'opérer dès le début en milieu liquide (bouillon peptoné), puis de déterminer le pouvoir antibiotique en repiquant en gélatine une goutte de contenu de chacun des tubes restés stériles, au cours de l'essai antigénétique.

Au cours de la guerre, on s'attacha particulièrement à déterminer la valeur des désinfectants utilisés pour le traitement des plaies infectées. On chercha surtout à se rapprocher, dans ces essais *in vitro*, des conditions d'utilisation des substances étudiées.

Perry Morgan ⁽²²¹⁾ laissait un certain temps en contact le désinfectant et les germes existant dans du pus. Il ensemençait ensuite sur gélose inclinée de petites quantités du mélange.

Emery ⁽⁹²⁾ utilisait comme milieux intermédiaires des milieux au sang.

Dakin et Dunham ⁽⁶⁶⁾ (1917) plaçaient des suspensions microbiennes au contact de l'antiseptique maintenu dans un milieu albumineux constitué par du sérum de cheval et de l'extrait de viande.

Vincent ⁽²⁹⁹⁾ (1917) mesurait l'action des désinfectants utilisés pour le traitement des plaies, en faisant agir ces substances sur du bouillon souillé par de la terre ou par de la sanie de gangrène gazeuse.

Nicolle et Jouan ⁽²⁰⁴⁾ (1918) faisaient agir les antiseptiques sur des suspensions de staphylocoques en bouillon additionné de sérum.

De leur côté, certains auteurs anglo-saxons, ayant reconnu les défauts des méthodes du « coefficient phénol », revinrent à des techniques plus simples. Parmi eux, Tilley ⁽²⁹⁴⁾, en 1921, puis Scott et Hill ⁽²⁷⁴⁾, en 1925, insistèrent particulièrement sur la nécessité d'essayer les désinfectants sur les germes mêmes qu'ils étaient destinés à détruire.

A la même époque parut le travail de Delcourt-Bernard ⁽⁷⁴⁾ (1926) relatif à « l'expertise des substances antiseptiques ». L'auteur proposait d'effectuer, d'une part, la détermination du pouvoir antigénétique ou « inhibitif » en milieu liquide, et, d'autre part, la détermination du pouvoir antibiotique ou « microbicide ». Pour cette dernière détermination, il proposait de mettre en expérience deux cultures d'âges différents, l'une âgée de 6 heures et l'autre de 24 heures. Des quantités égales de ces deux cultures fournissaient des nombres de germes différents et des bactéries de vitalité différente. D'autre part, l'auteur faisait agir la solution antiseptique pendant des temps différents : 3 heures et 13 heures, puis il repiquait, sur bouillon gélosé incliné, une anse de platine de chaque liquide.

Parmi les très nombreux essais effectués en vue d'établir la valeur pratique des désinfectants proposés pour des buts spéciaux, citons simplement, à titre d'exemples, ceux de Poetschke ⁽²²⁷⁾ (1925), qui étudiait les propriétés germicides des ciments dentaires sur des germes mis

en suspension dans de la salive, de Walker ⁽³⁰¹⁾, qui étudiait l'action bactéricide des savons en savonnant ses mains recouvertes de suspensions microbiennes. De nombreux autres noms pourraient être ajoutés à ceux-ci, mais cela n'apporterait aucune idée supplémentaire à notre travail. Remarquons seulement que le procédé de détermination des valeurs antiseptiques qui utilise des germes en suspension sans que soit fait un essai comparatif, a été employé par la majorité des auteurs qui ont simplement cherché à obtenir des résultats pratiques valables sans vouloir pénétrer profondément dans l'étude scientifique des antiseptiques. De là découlent les reproches que nous pouvons faire à ces diverses techniques. Bâties d'une façon un peu sommaire, elles n'ont pas tenu compte des multiples causes d'erreur qu'elles auraient dû éviter. Elles sont cependant bâties sur les conceptions les plus simples et doivent, après une mise au point soigneuse, donner des résultats plus rapides et plus exacts que les méthodes classiques examinées plus haut. C'est dans ce sens que nous avons dirigé nos propres recherches.

C. — MÉTHODES DESTINÉES A ÉTABLIR, OUTRE LA VALEUR DÉSINFECTANTE DES SUBSTANCES, LEUR POUVOIR DE DIFFUSION A TRAVERS UN MILIEU SOLIDE

Nous allons citer maintenant quelques techniques proposées dans le but d'étudier le pouvoir de pénétration ou plutôt de diffusion des substances désinfectantes.

Ces techniques utilisent, comme milieu d'action de l'antiseptique sur les germes, des milieux solides. Mais l'antiseptique n'est pas réparti uniformément dans la masse du milieu nutritif solidifié sur lequel sontensemencés les germes ; il est déposé en un point limité, d'où il doit diffuser pour atteindre les germes situés autour de ce point.

Ces techniques, qui sont, à l'origine, des tests d'activité antigénétique modifiés pour l'appréciation du pouvoir de diffusion, peuvent facilement devenir des techniques de détermination des valeurs antibiotiques. Il suffit, pour cela, de transporter dans du bouillon nutritif les portions du milieu nutritif solidifié où le désinfectant a arrêté le développement des germes. S'il se produit dans ce milieu neuf une culture ultérieure, c'est que les germes n'étaient qu'arrêtés dans leur développement. Si, au contraire, les subcultures sont négatives, c'est que l'antiseptique était en concentration suffisante pour produire une action antibiotique.

En 1918, Carnot et Dumont ⁽⁴⁴⁾ firent l'observation suivante : du bouillon gélosé liquéfié étaitensemencé et coulé en boîtes de Pétri ; au centre de la plaque, on plaçait un cylindre creux de verre ou de porcelaine, dentelé à sa partie inférieure. Dans ce cylindre on introduisait l'antiseptique en solution aqueuse, qui diffusait ensuite dans la gélose. Après incubation, on observait, au centre de la plaque, autour de l'antiseptique, une zone claire où la culture des germes était négative. Ceci

permettait d'étudier, en même temps que l'action antigénétique de la substance, les moyens de modifier, par addition de substances chimiques (acides ou autres), le pouvoir de pénétration de la substance considérée.

Par ailleurs, cette technique mettait en évidence l'influence favorisante, sur la croissance, de très faibles doses de substances antiseptiques, point sur lequel nous ne pouvons insister ici. Il apparaissait, en effet, des colonies bactériennes exubérantes dans la partie périphérique de la plaque, la plus éloignée de l'antiseptique.

Kendall et Edwards ⁽¹⁵⁵⁾ (1924) proposèrent de rechercher de la façon suivante le pouvoir de pénétration des substances désinfectantes :

On ensemence abondamment un milieu gélosé, puis on l'introduit dans une tube de verre, long de 1 mètre environ, et de 5 centimètres de diamètre, que l'on ferme aux deux bouts, à l'aide de bouchons de caoutchouc stériles. Au moment de l'essai, on place dans les solutions désinfectantes de petites rondelles de ce milieu ensemencé, que l'on laisse un certain temps dans la solution antiseptique. Ces rondelles de gélose sont ensuite placées dans des milieux de culture à une température favorable. On voit ainsi si les microbes ont bien été détruits, c'est-à-dire si la substance désinfectante a été capable de pénétrer dans la gélose pour y exercer son action.

Reddish ⁽²³⁷⁾, en 1928, imagina, pour étudier l'activité de certains désinfectants pour lesquels les méthodes habituelles n'étaient pas utilisables, une méthode sur plaques, qu'il modifia un peu plus tard pour établir la technique suivante :

Selon une technique identique à celle d'Himebaugh, il formait, au centre d'une plaque de bouillon gélosé additionné de sérum et ensemencé avec du staphylocoque, une petite cupule destinée à contenir le désinfectant en expérience. Cette cupule était effectuée en coulant le milieu gélosé dans une plaque ayant à son centre un bouchon de verre stérile que l'on enlevait ensuite. Toutes les craquelures autour de la cupule étaient comblées avec de la gélose partiellement liquéfiée. Ceci permettait de déterminer aussi bien le pouvoir de pénétration de l'antiseptique que son activité antigénétique et antibiotique.

Pour évaluer cette dernière, on repiquait en bouillon de viande, à intervalles de temps connus, des fractions du milieu gélosé prélevées dans la zone où s'était manifesté, autour de la cupule, un arrêt du développement des germes.

Pour les pommades et onguents antiseptiques, l'auteur préconisait d'étaler simplement les produits, portés à 37° C., sur une petite surface de gélose additionnée de sérum et préalablement ensemencée.

Récemment Wright ⁽²⁾ (1931), après avoir décrit la technique établie par Himebaugh ⁽¹⁴¹⁾ en 1924, technique que nous avons déjà citée au sujet de la détermination du pouvoir antigénétique (Voir page 9), a complété cet essai de la manière suivante, afin de pouvoir déterminer le pouvoir antibiotique de la substance en question. Dans la zone de gélose restée stérile autour de la cupule renfermant l'antiseptique, et à distances connues de cette cupule, on prélevait de petits disques de gélose

que l'on transportait dans des quantités suffisantes de bouillon nutritif pour diluer l'antiseptique entraîné, de telle sorte que son action antigénétique ne soit pas à craindre. On laissait alors les subcultures pendant 48 heures à 37°, puis on notait les tubes restés stériles. On savait ainsi jusqu'à quelle distance de la cupule avait pu s'exercer l'action antibiotique de la substance. Rappelons que c'est précisément cette technique qui fut choisie par Allen et Wright ⁽²⁾ pour l'essai de pénétration de l'antiseptique, essai qui fait partie d'un ensemble de techniques préconisées par les auteurs anglais pour l'essai général d'une substance.

Cet essai général, qu'il est difficile, en raison de sa complexité, de situer au milieu des nombreuses méthodes que nous avons examinées, a été présenté par Abbott Allen et Wright en 1931. Il est destiné, d'après les auteurs, à reproduire, autant que possible, les conditions mêmes que l'on retrouve dans la nature, pour l'emploi des désinfectants.

Cette méthode complexe d'Allen et Wright comprend, en ce qui concerne les essais *in vitro* :

a) Une détermination du « coefficient phénol » du corps étudié, effectuée selon la technique proposée par Reddish, technique que nous avons examinée ci dessus ;

b) Une détermination du pouvoir de pénétration de l'antiseptique, telle que nous l'avons examinée précédemment ;

c) Une détermination de l'activité de l'antiseptique en présence d'une « infection massive », selon la technique qu'Albert Allen ⁽¹⁾ avait préconisée en 1929.

On emploie des organismes de résistance connue à l'action désinfectante du phénol, et on régularise leur vitalité en procédant, les trois jours précédant l'essai, à des repiquages journaliers sur gélose inclinée. Pour l'essai, on utilise des cultures sur gélose inclinée, âgées de 24 heures. On ajoute, dans chacun des tubes de bouillon gélosé, maintenus à 37°, 10 centimètres cubes de solution désinfectante, de telle sorte que la surface de la gélose soit complètement recouverte par la solution désinfectante, les tubes de culture étant placés verticalement. A intervalles de 5, 10, 15, 30 et 60 minutes, on effectue des subcultures sur gélose inclinée, on les porte à l'étuve à 37°, et on examine, après 48 heures, si une culture s'est ou non développée.

Il est incontestable que les auteurs cités ont conçu l'essai antimicrobien d'une façon fort large et que l'ensemble des techniques qu'ils préconisent ont une valeur générale fort intéressante. Cependant, la base de leur technique reste la méthode du coefficient phénol ; nous avons vu qu'il n'était pas possible d'accepter le principe même de celle-ci. Quant aux deux essais complémentaires, ils ont été préconisés par Abbott Allen et Wright dans un louable souci d'accord avec les conditions pratiques. Il est cependant bien improbable que les contaminations se produisent dans la nature par des quantités de germes aussi extraordinairement grandes que celles qu'ils emploient. De plus, leur deuxième essai (et cette réflexion s'applique, en général, à tous les essais du pouvoir de diffusion de l'antiseptique) ne saurait donner une idée, même approchée, du pouvoir de pénétration que posséderont les antiseptiques étudiés, en présence des tissus animaux. Les phénomènes de péné-

tration dans les cellules animales ou végétales, à travers les membranes et les épithéliums, sont, en effet, des phénomènes d'une grande complexité, et, malheureusement, encore partiellement inconnus, qu'il est un peu trop simple d'assimiler aux phénomènes de diffusion tels qu'ils se présentent dans les méthodes décrites par les auteurs.

D. — ÉTUDES THÉORIQUES SUR LE PROCESSUS DE DÉSINFECTION. FORMULES MATHÉMATIQUES EXPRIMANT LA FORCE ANTISEPTIQUE

Bien que l'objet de ce travail soit d'examiner les méthodes pratiques d'essai des substances antimicrobiennes, il nous est impossible de passer sous silence les études, de caractère plus théorique, qui ont trait à l'évolution du processus de la désinfection, soit dans son intensité, soit dans sa durée. D'ailleurs, certains de leurs auteurs, étudiant la désinfection en tant que phénomène progressif, afin d'établir les lois qui la régissent, ont été amenés à formuler des règles mathématiques utilisables pour la mesure des forces antiseptiques. Mais ces tentatives n'ont pas définitivement abouti. Nous allons brièvement rendre compte des principaux travaux effectués dans cette voie.

Les premières études semblent dues à Paul et Krönig ⁽¹⁶⁴⁾. Ces auteurs, étudiant l'évolution du processus de destruction des spores de bacille du charbon par le sublimé, utilisèrent la méthode des grenats. Ils cherchaient le nombre des germes *survivants*, après action, durant des temps différents, de solutions de sublimé à des titres divers. Ikeda ⁽¹⁴⁸⁾ (1897) tira des chiffres publiés par Paul et Krönig une loi établissant que le nombre des germes survivants était inversement proportionnel à une puissance donnée de la concentration du désinfectant employé.

Plus tard, Madsen et Nyman ⁽¹⁸⁸⁾ (1907-1908), et, de son côté, Miss Chick, travaillant simultanément sur ce sujet, trouvèrent que, « durant le processus de destruction des spores de bacille du charbon par des agents chimiques (phénol, HgCl_2), la concentration des spores restées vivantes diminuait avec le temps selon un ordre logarithmique, et que le nombre des spores détruites par unité de temps était proportionnel au nombre de spores présentes, au même moment, dans l'unité de volume du milieu » (Miss Chick). Ces résultats coïncidaient avec ceux trouvés précédemment par Paul et Krönig, mais non interprétés.

Madsen et Nyman et Miss Chick en conclurent que, si le désinfectant était présent en grand excès, la désinfection se faisait de la même façon qu'une réaction chimique monomoléculaire, et pouvait s'exprimer par le rapport suivant :

$$-\frac{dn}{dt} = kn, \text{ où } \frac{1}{t^1 - t^2} \log. \frac{n^1}{n^2} = K,$$

où n^1 et n^2 sont les nombres de bactéries survivantes par unité de temps, après les temps t^1 et t^2 respectivement.

La courbe suivante, donnée par Madsen et Nyman, illustre cette relation (fig. 2.)

Miss Chick admettait qu'il existait peu de différences permanentes entre la résistance de diverses spores d'une même culture, et que la progression du phénomène était occasionnée par des modifications temporaires dans « l'énergie interne des molécules constituant les protéines bactériennes ».

Mais ces résultats ne furent pas confirmés par tous les auteurs. Eijkmann⁽⁸⁹⁾ (1908) et Hewlett⁽¹³⁷⁾ (1909) les contestèrent.

Eijkmann, étudiant l'action du phénol et de l'eau chaude sur le coli-

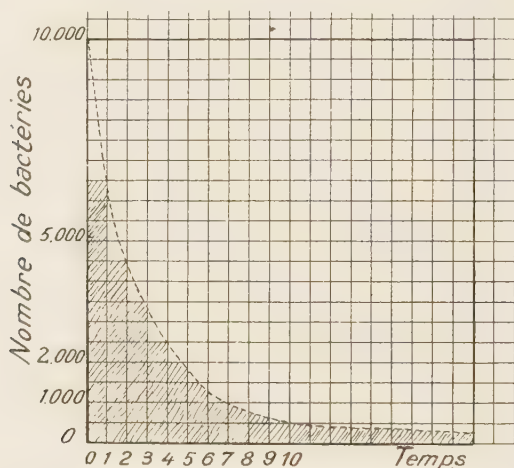


Fig. 2. — Courbe de destruction des bactéries (d'après MADSEN et NYMAN).

bacille, trouva que la vitesse de désinfection n'était pas proportionnelle à la concentration des survivants, mais beaucoup plus lente, sauf si l'on considérait une courte période placée au milieu du processus, période qui était justement celle étudiée par Miss Chick.

Miss Chick, reprenant cette étude, insista sur ce fait que les résultats divergents obtenus par Eijkmann l'avaient été non pas sur des spores, mais sur des formes végétatives ; Miss Chick admettait, dans ce cas, des « différences permanentes de résistance parmi les individus de la culture, différences liées à l'âge même de cette culture ». (Rappelons qu'elle n'admettait que des modifications temporaires de résistance pour les formes sporulées.) Aussi, afin d'éliminer les influences accessoires dues au vieillissement d'une culture de 24 heures, Miss Chick reprit-elle l'étude du phénomène en mettant en expérience des individus microbiens jeunes, obtenus par subcultures successives à courts intervalles de temps. En opérant ainsi, elle put observer de nouveau, pour ces formes végétatives, des résultats approximativement conformes à la loi logarithmique.

Elle en conclut que la désinfection par le phénol s'effectuait selon la loi logarithmique ci-dessus énoncée, aussi bien vis-à-vis des spores de charbon que des formes végétatives (bacille typhique, colibacille, staphylocoque), pourvu que ces formes végétatives soient des formes jeunes.

Madsen et Nyman ⁽¹⁸⁸⁾, de leur côté, jugeaient également possible de rapprocher le processus de désinfection d'une réaction monomoléculaire.

On pouvait donc parler d'une « constante de vitesse » de désinfection susceptible de servir de base pour mesurer l'activité d'une substance antimicrobienne.

Mais ces données mathématiques furent vivement critiquées par Reichenbach ⁽²⁴⁵⁾ (1910-1911) et surtout par Reichel ⁽²⁴³⁾ (1909). Ces auteurs n'admirent pas que la force désinfectante pût être mesurée par la rapidité avec laquelle décroît le *nombre* des germes soumis à cette action désinfectante.

D'après eux, en effet, cet ordre de décroissance n'est aucunement la base de l'action, mais seulement un phénomène fortuit lié à des degrés inégaux de résistance des germes, et il convient bien mieux de mesurer les *temps* nécessaires à la destruction totale d'une quantité donnée de germes connus.

En effet, d'après Reichenbach, le processus de désinfection n'est pas assimilable à une réaction chimique monomoléculaire. Dans un processus chimique, les molécules ne sont pas simultanément aptes à entrer en réaction et, par suite, le nombre des molécules capables de réagir suit les lois de la probabilité, c'est-à-dire que ce nombre est naturellement proportionnel au nombre des molécules encore existantes. Les bactéries, au contraire, se trouvent toutes dans une situation identique, vis-à-vis de l'agent désinfectant, lequel est toujours en grand excès. Si donc on observe, pour les différents germes, une durée de mort inégale, c'est que leur résistance était antérieurement inégale. Rappelons que Miss Chick expliquait ces faits par des modifications périodiques de la résistance des germes pris isolément, mais, comme le remarque Reichel, cette explication n'a pas été confirmée par l'expérience. Quant à Reichenbach, il jugeait possible que la résistance des générations successives, constituant une même culture, diminuât par suite du vieillissement du milieu nutritif. Quoi qu'il en fût, Reichenbach pensait cependant que la « soi-disant constante de désinfection » pouvait, bien qu'il la conçût différemment, être calculée dans la majorité des cas et servir à déterminer la valeur d'un agent désinfectant. Mais il ne fallait pas oublier que cette constante n'était valable que pour une constitution déterminée de la masse bactérienne étudiée, et, pour que les calculs correspondent à la réalité, il fallait pouvoir prouver, dans chaque cas, que cette constitution existait réellement. Ceci entraînait à de nombreuses déterminations, ce qui ajoutait de grandes difficultés pratiques à l'incertitude théorique. Par ailleurs, les variations possibles des différents facteurs de l'essai influençaient trop ces variations théoriques pour que l'on pût accorder à celles-ci une réelle valeur pratique.

De son côté, Reichel proposa de déterminer, pour caractériser un

désinfectant, sa « courbe toxique » d'action, c'est-à-dire la relation entre la durée de destruction des germes (T) et la concentration active du désinfectant (P). Il exprimait cette relation par l'équation : $TP^n = R$, où R est la constante de résistance, qui dépend uniquement de la nature du désinfectant et des germes, toutes les influences accessoires étant considérées comme constantes. Elle représente donc, dans chaque cas, c'est-à-dire pour une valeur quelconque de n , le temps de destruction pour une valeur de concentration 1.

L'exposant constant n caractérise l'inflexion de la courbe hyperbolique correspondant à l'équation ci-dessus. On pourrait aussi bien le remplacer par un exposant constant du temps : m , et l'équation deviendrait : $TmP = D$, où D représente la constante de dose, c'est-à-dire la concentration nécessaire pour agir dans l'unité de temps.

Reichel considère que cette deuxième forme de l'équation convient mieux à la détermination de l'activité d'une substance inconnue, pour laquelle on calcule généralement la concentration active en un temps déterminé. La première forme, au contraire, est destinée à déterminer le temps qu'exige pour agir une concentration donnée du désinfectant. Pour cet auteur, la seule utilité de la détermination de la vitesse de désinfection est de donner les valeurs « Temps » nécessaires à la destruction d'égales fractions de quantités données de germes. Ces valeurs étant établies pour une série de concentrations du même désinfectant, il est ainsi possible d'établir le rapport entre la durée de destruction de germes de même résistance et la concentration du désinfectant.

C'est à des conceptions identiques que sont arrivés Paul, Birstein et Reuss ⁽²¹⁸⁾ (1910), ainsi que Phelps ⁽²²⁴⁾, par la voie mathématique.

Gregersen ⁽¹¹⁷⁾ (1916) arriva à des équations identiques, en étudiant l'action de quelques désinfectants (HgCl²—ClH—I.KI—formaldéhyde, phénol-thymol-hydrate de chloral) par la méthode de Paul et Krönig et en déterminant également les temps nécessaires à la destruction totale des germes. Il conclut de ses expériences que : « Ce serait un grand pas théorique et pratique si l'on pouvait trouver, pour les divers désinfectants, un tel rapport constant entre le temps de destruction totale T et la concentration de la substance désinfectante C, rapport représenté par l'équation : $TC^n = K$. Si l'on connaissait K que l'on appellerait « constante de désinfection, on pourrait trouver, pour une température donnée et une émulsion bactérienne donnée, T, et ainsi l'activité désinfectante de la substance. En recherchant les modifications de la constante, par exemple, pour diverses températures, on pourrait obtenir une règle pour l'influence de ce facteur sur l'activité désinfectante. »

On pourrait également exprimer l'activité relative d'un désinfectant donné, vis-à-vis de bactéries différentes, par le rapport entre les valeurs respectives de K pour ces diverses bactéries.

Plus récemment, les travaux de Loeb et Northrop ⁽¹⁸⁵⁾ (1917), Brooks ⁽³⁵⁾ (1919), Winslow et Falk ⁽³⁰⁸⁾ (1920), Cohen ⁽⁵⁴⁾ (1921-1922), tendirent également à abandonner la conception d'une stricte conformité de la réaction de désinfection avec une loi logarithmique.

Enfin, divers travaux sur les courbes de destruction furent encore

effectués récemment par Hayaishi ⁽¹³¹⁾ (1924), Rieger et Trauner ⁽²⁵⁵⁾ (1927), Reichel et Rieger ⁽²⁴⁴⁾ (1927).

Nous n'insisterons pas davantage sur ces diverses tentatives pour exprimer mathématiquement l'activité des substances antimicrobiennes. Nous nous bornerons à constater que leurs auteurs sont loin d'être d'accord sur la règle à adopter en pratique, et que, malgré les grands avantages qu'elles pourraient apporter, de telles méthodes ne sauraient être utilisées tant que nous n'aurons pas des certitudes plus grandes sur le véritable mécanisme du processus de désinfection.

Nous n'étudierons pas non plus ici les diverses recherches théoriques, effectuées pour étudier le mécanisme de l'action désinfectante, basées sur l'emploi de doses croissantes de substances antiseptiques.

E. — MESURE DES POUVOIRS ANTISEPTIQUES PAR APPRÉCIATION DE L'INFLUENCE EXERCÉE SUR UNE FONCTION BIOCHIMIQUE DES BACTÉRIES

Tous les auteurs des méthodes que nous venons d'étudier, y compris les méthodes théoriques rapidement citées, cherchaient à déterminer l'influence des substances antiseptiques sur les bactéries elles-mêmes, en utilisant comme test de vitalité des bactéries leur faculté de se multiplier.

Il nous reste maintenant à examiner quelques méthodes dans lesquelles on n'estime pas l'activité désinfectante d'après sa faculté de diminuer plus ou moins rapidement le nombre des individus d'une population bactérienne, ou de les détruire tous, mais où l'on choisit, comme test de la vitalité microbienne, l'action biochimique qu'exercent ces germes sur certains constituants chimiques du milieu, ou quelque autre manifestation de la vie cellulaire.

Ainsi, dès 1872, Petit ⁽²²³⁾, étudia l'influence, sur les fermentations, de l'addition de certaines substances chimiques, en prenant comme mesure de l'activité fermentative les quantités de CO² dégagées.

Depuis, beaucoup d'autres auteurs, Biernacki ⁽²³⁾, Schultz ⁽²⁷²⁾, Abderhalden, utilisèrent des appareils tels que ceux mis au point par Paul Regnard pour mesurer le dégagement gazeux produit par la fermentation alcoolique, et apprécier ainsi l'activité d'une levure et l'influence, sur la fermentation, de diverses substances antiseptiques. C'est ainsi que Biernacki ⁽²³⁾ (1891) détermina les doses de divers produits qui arrêtent la fermentation alcoolique. Ceci lui permit d'obtenir des résultats intéressants, et, notamment, d'observer, l'un des premiers, l'action stimulante de très faibles doses de substances antiseptiques.

Il nous est impossible de citer ici tous les auteurs qui ont travaillé dans cette voie. Citons seulement parmi eux : Dreser ⁽⁸⁰⁾ (1917), Pilcher et Sollmann ⁽²²⁵⁾ (1922), Peterson ⁽²²²⁾ (1922), Sara Branham ⁽³³⁾

(1929), qui décrivent des méthodes de comparaison des substances antiseptiques basées sur la mesure des quantités de CO_2 dégagées au cours de la fermentation par la levure, en présence de ces diverses substances.

Plus récemment, Dannenberg ⁽⁶⁸⁾ (1930) et Niethammer ⁽²⁰⁵⁾ (1927) ont utilisé cette méthode pour vérifier la validité de la loi d'Ardnt-Schultz ⁽²⁷³⁾, et Von Euler ⁽⁹⁶⁾ et son école ont utilisé, pour mesurer l'activité des levures, le dégagement de CO_2 , au cours de leurs nombreux travaux sur l'action de l'activateur Z.

Notons encore que certains auteurs, comme Werner Lipschitz ⁽¹⁸¹⁾, en 1923, recherchèrent la valeur thérapeutique des désinfectants en mesurant leur pouvoir d'arrêt de la respiration cellulaire, respectivement sur les bactéries et sur le tissu musculaire. Le rapport des deux valeurs obtenues était le quotient d'activité thérapeutique de la substance étudiée. Ce mode opératoire découlait d'une conception physique de l'activité antiseptique, voisine de la théorie de l'action narcotique émise par Verworn.

Enfin, citons, pour terminer, les essais poursuivis depuis de nombreuses années par Ch. Richet ⁽²⁴⁹⁾, Chassevant ⁽⁴⁵⁾ (1898), Cardot ⁽⁴²⁾ et Bachrach ⁽⁶⁾, etc..., qui ont suivi l'influence sur la fermentation lactique de facteurs antiseptiques divers, en mesurant volumétriquement l'acide lactique formé au cours de la fermentation.

Il nous semble difficile de ranger véritablement, parmi les méthodes de mesure des pouvoirs antiseptiques, ces techniques dont nous sommes loin, cependant, de discuter la valeur particulière. Il suffit, en effet, de remarquer que ces méthodes ne mesurent pas, à proprement parler, l'action des antiseptiques sur les micro-organismes eux-mêmes, mais leur action sur les ferments de ceux-ci. Or, il est bien connu, et les travaux de Régnier et David ⁽²³⁹⁾ l'ont encore mis en évidence récemment, que l'action fermentative subsiste longtemps après l'arrêt de la multiplication : « Quand les bactéries se détruisent, les ferments solubles mis en liberté continuent leur action, et, par conséquent, les modifications chimiques du milieu ne sont pas forcément parallèles au développement microbien. »

F. — MÉTHODES RÉCENTES TENDANT A ÉTABLIR SIMULTANÉMENT L'ACTIVITÉ ANTIMICROBIENNE ET LE DEGRÉ DE NOCIVITÉ POUR LES TISSUS (CULTURES DE TISSUS)

Pour être complète, il nous faudrait encore citer quelques essais effectués dans le but de rechercher, en même temps que le pouvoir désinfectant des substances, leur degré de nocivité pour les cellules des tissus.

C'est ainsi que Robert Lambert ⁽¹⁶⁸⁾ (1916), Tinker et Sutton ⁽²⁹⁵⁾.

(1928), Allen et Wright ⁽²⁾ (1931), et, tout récemment, Buchsbaum, Ralph et William Bloom ⁽⁴¹⁾ (1931), ont conseillé de faire agir les désinfectants sur des germes imprégnant des tissus cultivés artificiellement.

Les derniers auteurs, particulièrement, déterminèrent les concentrations des désinfectants étudiés, qui tuaient les germes sans attaquer les cellules.

Nous n'insisterons pas sur ce point, qui est un autre aspect du problème de l'essai des désinfectants, d'ailleurs fort intéressant, et que nous nous proposons de reprendre plus tard. Nous nous rangeons parfaitement à l'avis que la valeur pratique d'un désinfectant destiné à l'usage thérapeutique dépend, dans une large mesure, de son innocuité pour les tissus. Mais il n'en est pas moins vrai que l'essai de base de tout désinfectant est d'abord de rechercher son action antimicrobienne *pure* sur les germes isolés.

Par ailleurs, nous traitons ici de l'essai des substances antimicrobiennes en général, et non seulement des corps destinés à détruire les germes placés dans ou sur les tissus de l'organisme vivant. Étant donnée la complexité de la question, que mettent en évidence les essais précédemment décrits, il nous est impossible, pour le moment, d'examiner les points particuliers qui doivent intervenir dans l'essai d'un désinfectant pour compléter l'essai antimicrobien pur, et justifier l'adaptation de tel ou tel antiseptique à tel ou tel but.

CHAPITRE II

ÉTUDE DES DIVERS FACTEURS INTERVENANT AU COURS DE L'ESSAI DES SUBSTANCES ANTIMICROBIENNES

Nous venons de passer en revue, dans le premier chapitre, les principales méthodes jusqu'ici proposées pour mesurer le pouvoir antimicrobien des substances chimiques. Nous avons ainsi rencontré certaines techniques qui, bien étudiées, ont pris rang de méthodes classiques. Mais nous avons vu que toutes présentaient de graves inconvénients, et aucune d'elles ne nous a semblé satisfaisante pour nos propres essais.

Nous nous sommes donc donné pour tâche, en utilisant les données acquises et en complétant les points insuffisamment précis, de chercher à établir une technique sinon parfaite, tout au moins exempte des principaux reproches que l'on pouvait faire aux autres. Nous avons rejeté d'emblée, pour les raisons ci-dessus indiquées, les techniques des portegermes et les méthodes des suspensions comportant un essai comparatif avec un désinfectant étalon.

Nous avons adopté les essais effectués sur des *suspensions de germes*, et, revenant à l'idée la plus anciennement conçue, nous avons cherché la valeur, en quelque sorte *absolue*, des désinfectants, pensant arriver ainsi à des chiffres assez stables, à condition, toutefois, d'opérer dans des conditions absolument définies.

Pour cela, nous avons jugé indispensable de fixer, avec la plus grande précision possible, tous les points de la technique, afin d'éliminer, dans la mesure du possible, les variations apportées par l'un quelconque des facteurs de l'essai.

Dans ce *deuxième chapitre*, nous examinerons donc successivement les divers facteurs qui interviennent dans la détermination de l'activité antimicrobienne par la méthode des suspensions.

A propos de chacun de ces facteurs, nous examinerons brièvement les essais antérieurs aux nôtres, puis les résultats obtenus par nos propres essais. Enfin, nous chercherons, pour chacun d'eux, comment il convient de les fixer pour assurer à la technique le maximum de stabilité.

Nous examinerons tout d'abord ce qui concerne l'essai antibiotique, le plus complexe, puis nous noterons, pour terminer, ce qui a rapport à l'essai antigénétique.

En ce qui concerne les divers facteurs à examiner, nous savons que les trois principaux termes en jeu dans toute réaction de désinfection sont :

1° *La solution désinfectante* ; 2° *les microbes* ; 3° *le milieu où s'effectue leur contact*.

Nous aurons donc à examiner successivement les facteurs liés à ces trois termes.

La *substance antiseptique*, supposée chimiquement définie, peut cependant varier dans la nature de sa solution (*pH* variables, degré d'ionisation, tension superficielle différents).

L'*organisme microbien* en expérience peut varier en *qualité* (selon l'espèce, la souche utilisées, selon l'âge ou la vitalité des germes). Il peut varier aussi en *quantité*, selon la concentration microbienne choisie pour préparer les suspensions. Il peut enfin varier selon le milieu liquide utilisé pour émulsionner les germes.

Le *milieu intermédiaire* où se fait le contact entre l'antiseptique et les germes, et qu'il est difficile de différencier du solvant de l'antiseptique, peut présenter des qualités physiques ou chimiques différentes.

Il faudra également tenir compte des facteurs de l'essai liés à des conditions extérieures, et qui sont : la *température* à laquelle est effectué l'essai, le *temps* durant lequel on laisse agir le désinfectant sur les germes, les conditions réalisées pour vérifier les résultats de l'action désinfectante.

Il faudra ensuite examiner ce qui concerne plus particulièrement la *détermination du pouvoir antigénétique*, et, enfin, voir dans quelle mesure les propriétés antigénétiques de la substance étudiée sont susceptibles d'influencer la détermination de son pouvoir antibiotique.

Parmi tous ces facteurs en jeu dans l'action désinfectante, un seul restera variable : c'est la *concentration de la substance désinfectante*, puisque notre but sera précisément de rechercher la concentration efficace en un temps donné. Tous les autres facteurs seront maintenus fixes, autant que possible, car, comme nous allons le voir, la variation de l'un quelconque entraînerait des modifications imprévisibles dans les résultats de l'essai. Alors que certains de ces facteurs seront relativement faciles à fixer, la fixation de certains autres, tels que la qualité des germes en expérience, présentera de grandes difficultés. Notons enfin qu'il est certains facteurs qu'il serait fort intéressant d'étudier du point de vue théorique, mais dont l'examen nous entraînerait hors des limites que nous nous sommes fixées. Ce sont les variations apportées à l'action

antiseptique par les modifications physiques ou physico-chimiques de la substance désinfectante elle-même. Nous considérerons donc les substances désinfectantes sous leur forme d'utilisation habituelle avec toutes les qualités qui appartiennent à cette forme. Nous nous bornerons seulement, et ceci afin de nous rapprocher des conditions de la pratique, à faire varier le milieu intermédiaire où s'effectue leur action, en lui ajoutant du chlorure de sodium ou de l'albumine.

En résumé, dans le chapitre que nous abordons, nous allons examiner les divers facteurs qui interviennent au cours de l'essai des substances antimicrobiennes, en étudiant successivement :

A. — LES FACTEURS INFLUENÇANT LA MESURE DU POUVOIR ANTIBIOTIQUE.

I. *Facteurs liés au désinfectant (pureté, stabilité).*

II. *Facteurs liés à l'organisme microbien en expérience :*

a. Influence de la quantité de germes ;

b. Influence de la qualité des germes :

1^o Influence de l'espèce microbienne ;

2^o Influence de la souche microbienne (origine, milieux de culture et de conservation) ;

3^o Influence de l'âge de la culture.

c. Influence du milieu de suspension des germes.

III. *Facteurs liés à la nature du milieu intermédiaire :*

a. Influence des matières salines ;

b. Influence de l'albumine.

IV. *Facteurs dépendant des conditions extérieures à l'essai :*

a. Influence de la température de l'essai ;

b. Influence du temps de contact entre l'antiseptique et les germes.

V. *Facteurs pouvant modifier la deuxième phase de l'action antibiotique : l'essai de survie des germes. Conditions de la subculture.*

VI. *Le choix de la variable dans la mesure de l'action antibiotique.*

B. — LES FACTEURS INFLUENÇANT PLUS PARTICULIÈREMENT LA MESURE DU POUVOIR ANTIGÉNÉTIQUE.

C. — L'INFLUENCE DU POUVOIR ANTIGÉNÉTIQUE SUR LA DÉTERMINATION DU POUVOIR ANTIBIOTIQUE.

A.— FACTEURS INFLUENÇANT LA DÉTERMINATION DU POUVOIR ANTIBIOTIQUE

I. — FACTEURS LIÉS AU DÉSINFECTANT

Il est évident que le processus même de la désinfection doit varier dans de larges limites, suivant la nature des désinfectants considérés, ou suivant leur mode de présentation. Pour bien comprendre ceci, il nous faudrait rappeler brièvement le mécanisme de l'action désinfectante ou tout au moins les hypothèses émises à son sujet. Mais ceci nous emmènerait trop loin, nous dépasserions le cadre de notre travail. Tout en connaissant, donc, l'influence que peuvent exercer, sur les mesures des actions désinfectantes, certains facteurs physico-chimiques (pH des solutions, activité superficielle, degré d'ionisation des électrolytes, etc...), il ne nous est pas possible de traiter ici en détail ces divers points. Il nous semble cependant nécessaire d'insister sur certaines qualités que doit présenter le désinfectant, ou sa solution, pour que l'essai puisse apporter des résultats valables.

1° Il faut, en premier lieu, que le désinfectant soit pur, ou, tout au moins, de *composition constante*.

En effet, si les substances chimiques étudiées contenaient des quantités variables de substances étrangères, les résultats trouvés au cours de différents essais seraient évidemment irréguliers ;

2° Il faut que la substance étudiée soit *suffisamment stable*, qu'elle ne soit pas trop facilement décomposable par l'oxygène de l'air, l'humidité, ou par d'autres facteurs physiques, afin que nous puissions facilement la retrouver dans le même état au cours d'essais successifs ;

3° Enfin, puisque, en ce qui nous concerne, nous n'envisageons que l'essai des substances en solution dans l'eau, il nous faudra préparer avec soin les solutions aqueuses qui serviront à l'essai. Les quantités de substances chimiques nécessaires doivent être pesées avec précision, et les quantités d'eau servant à les dissoudre mesurées avec exactitude, afin d'établir des solutions dont la concentration en grammes par rapport au volume total de la solution aqueuse soit parfaitement définie.

La dissolution de la substance désinfectante doit être faite avec toutes les précautions habituelles, en évitant toute manipulation (chauffage prolongé, par exemple) susceptible d'altérer la constitution chimique de la substance utilisée. L'eau distillée utilisée dans ce but doit être fraîche, parfaitement privée de sels et de substances organiques, et doit présenter un pH aussi voisin que possible de la neutralité. Il est à conseiller d'utiliser une eau bidistillée, la première fois sur un peu

d'acide phosphorique et, la deuxième fois, sur un peu de baryte. Il est évident que les solutions doivent être préparées au dernier moment, immédiatement avant l'essai.

Dans les cas où la solubilité dans l'eau de la substance envisagée est insuffisante, il convient de l'augmenter par addition, et ceci particulièrement pour les produits phénoliques, de lessives alcalines, de produits savonneux, ou d'autres substances influençant la tension superficielle, ou quelque autre qualité physique du milieu. Il est bien entendu que les résultats obtenus dans ce cas ne sauraient être généralisés, et qu'ils ne sont valables que dans les conditions de l'essai, ceci d'autant plus que la substance adjuvante est parfois capable d'exercer par elle-même une action désinfectante.

Il convient encore de noter ici que de nombreux corps désinfectants ont été essayés, non pas à l'état de dissolution totale, mais dans un état de pseudo-solution assez voisin de l'état colloïdal. La préparation de telles solutions nécessite de grandes précautions pour que leur action puisse être régulière. On sait, en effet, à quel point l'état sous lequel se présentent les substances colloïdales influence les réactions chimiques, physiques ou biologiques, qu'elles peuvent effectuer.

En résumé, dans la réaction de désinfection, comme dans toute autre réaction, il nous faut utiliser des substances telles et agir dans de telles conditions que nous puissions reproduire exactement les conditions d'une première expérience.

II. — FACTEURS LIÉS A L'ORGANISME MICROBIEN EN EXPÉRIENCE

A. — Influence sur les résultats de l'essai du nombre de germes traités par le désinfectant.

Il est absolument nécessaire, dans un essai de mesure de l'activité d'un désinfectant, d'avoir non seulement une idée approximative, mais une connaissance exacte de la quantité de germes mise en expérience. Définir à un milligramme près, et souvent avec une plus grande précision, le poids de substance antiseptique mise en jeu, et laisser dans une imprécision totale le nombre des germes sur lesquels il aura à agir, c'est tenir volontairement dans l'ombre l'un des facteurs principaux de la réaction.

L'influence sur le résultat de la désinfection du nombre de germes mis en jeu est, d'ailleurs, connue depuis longtemps, et bon nombre d'auteurs, sans pour cela proposer des chiffres précis, l'ont déjà remarquée. Citons, parmi ces auteurs, les noms de Behring⁽¹⁶⁾ (1890), Boer, Goppert (1891), Grüber (1892), Paul et Krönig (1897), qui observèrent que l'action des agents antimicrobiens en général (y compris la chaleur), se faisait sentir d'une façon beaucoup plus marquée sur des émulsions

peu concentrées en germes que sur des émulsions très chargées en bactéries.

De même, Ficker ⁽⁹⁸⁾, en 1898, soumettant des émulsions de vibrion cholérique à des températures élevées, observa qu'un séjour de 10 minutes à 45°C. suffisait à détruire des émulsions diluées de ce germe, alors que des émulsions concentrées survivaient encore à cette température après 45 minutes. Il montra, d'autre part, que des suspensions diluées de vibrion cholérique étaient plus rapidement tuées par l'eau distillée, la solution de chlorure de sodium, ou la chaleur, que des suspensions épaisses.

Pour expliquer l'augmentation de résistance des suspensions les plus concentrées en germes, Ficker pensa que les bactéries transportaient avec elles, hors du milieu de culture, des substances nutritives provenant des corps bactériens, et que ces substances, apportées à l'eau distillée servant à émulsionner les germes, et évidemment d'autant plus abondantes que les germes émulsionnés étaient plus nombreux, leur apportaient en même temps la faculté de résister plus longtemps aux agents destructeurs.

Il émit également l'hypothèse que l'apport des matières salines provenant du milieu nutritif, dans un milieu privé de sels, n'était pas sans modifier la pression osmotique, et, par suite, les conditions vitales de ce milieu.

Un peu plus tard, V. Lingelsheim et Eijkmann ⁽⁸⁹⁾ rapportèrent des observations semblables, dans lesquelles un plus grand nombre de colibacilles par centimètre cube augmentait la résistance à la chaleur d'une émulsion de ce germe. Eijkmann admit que cette action devait être attribuée à des substances protectrices cédées au milieu par les bactéries mortes.

En 1908, Miss Chick et Martin, ayant formulé la loi régissant, d'après eux, la marche du processus de désinfection, telle que nous l'avons indiquée ci-dessus, conclurent que le temps nécessaire à la désinfection d'une émulsion bactérienne par le phénol était d'autant plus long que le nombre des germes contenus dans l'unité de volume de cette émulsion était lui-même plus grand. Ainsi, la désinfection du bacille paratyphique à 21°C., avec une solution de phénol à 8 p. 1000, demandait : 2 minutes et 15 secondes, pour une émulsion contenant 187 000 germes par unité de volume, et 34 minutes et 30 secondes pour une émulsion contenant 66.000.000 de germes par unité de volume.

Quelques années plus tard, Dengler ⁽⁷⁸⁾, et surtout Hailer, étudièrent également l'influence de la quantité de germes dans des essais de désinfectants, effectués sur des suspensions de germes. Hailer pensait que plus le nombre de germes prélevés et ensemencés pour l'essai était grand, plus l'on courait de chances d'effectuer l'essai sur des bactéries de plus grande résistance. Cet auteur considérait, en effet, que, dans une culture bactérienne, les germes de grande résistance sont les moins nombreux.

De son côté, Reichenbach admettait également que la durée de la désinfection par divers agents (chaleur, lumière, agents chimiques) était en rapport étroit avec la masse initiale des germes mis en expérience (loi logarithmique de Madsen et Nyman). Mais il pensait, comme nous l'avons vu, contrairement à Miss Chick, que l'ordre de destruction

des germes était lié uniquement à des différences dans la résistance individuelle des germes.

Toutefois, d'après Reichenbach, la durée de destruction n'augmente pas indéfiniment à mesure que croît le nombre initial des germes soumis à cette destruction. Elle augmente seulement jusqu'à une certaine limite, laquelle est atteinte lorsque se trouve dans l'ensemencement un germe, au moins, de résistance maxima. Il importait donc, de ce point de vue, de choisir l'émulsion suffisamment concentrée en germes pour être sûr d'y trouver au moins un germe de la plus grande résistance. Mais, de plus, Reichenbach constata que la densité de l'émulsion microbienne, c'est-à-dire le rapport de la masse bactérienne au volume total de l'émulsion, ou épaisseur de l'émulsion, pouvait, de son côté, exercer une action de défense contre la désinfection. Il y avait donc opposition entre les deux exigences, dont l'une imposait la nécessité d'utiliser un grand nombre de germes, et l'autre la nécessité d'agir sur une émulsion peu concentrée. L'auteur tenta, du point de vue théorique, une dissociation de ces deux influences, mais il ne réussit pas à tourner la difficulté du point de vue pratique. Il proposa donc finalement d'utiliser des émulsions qui ne fussent pas trop denses, et d'en prélever des quantités aussi grandes que possible pour effectuer les subcultures. Nous verrons plus loin que cette proposition de l'auteur se heurte à une nouvelle cause d'erreur, par suite du transport, dans la subculture, de quantités non négligeables d'antiseptique.

Bruno Lange (¹⁶⁹) effectua, en 1922, des travaux très poussés sur cette question. Il chercha spécialement à quelles causes on pouvait attribuer le retard apporté à la désinfection par la présence d'une grande quantité de germes. Il montra, en premier lieu, que la densité de l'émulsion jouait, pour ce phénomène, un rôle plus important que le nombre absolu des germes. Étudiant ensuite la part qui revenait à la résistance individuelle des germes, Lange ne crut pas pouvoir donner une importance toute spéciale à la *résistance naturelle* des germes, telle qu'elle avait été envisagée par les auteurs précédents. Sans nier qu'il existât des différences de résistance individuelle capables de se manifester dès le début de l'essai, il pensait que se produisait, au cours même de l'essai, une sorte d'adaptation à l'action défavorable exercée sur les bactéries, adaptation irrégulière dépendant avant tout des conditions de l'essai, créant des résistances particulières, plus grandes, non prévisibles, pour un certain nombre de bactéries. Il jugeait que des facteurs particuliers à chaque essai, tels que l'inégalité de répartition des germes, l'accumulation des germes en certains points, en particulier à proximité des parois du récipient, exerçaient une grande influence sur les variations de résistance des germes.

Enfin, B. Lange montra qu'en ajoutant à des suspensions de germes vivants une certaine quantité de germes morts, ou même de germes vivants d'une autre espèce, il se produisait une augmentation de la résistance à la désinfection. Il pensa, de ce fait, que l'augmentation de résistance produite par la mise en jeu de grandes quantités de bactéries pouvait provenir d'une diminution de la concentration de la substance désinfectante par adsorption sur tous les germes, morts et vivants.

Par ailleurs, l'auteur admit encore l'hypothèse de l'existence de subs-

tances bactériennes protectrices vis-à-vis des agents désinfectants, substances provenant des corps bactériens eux-mêmes sans qu'il soit question de matériel nutritif adhérent, et se trouvant évidemment plus abondantes dans les émulsions de très grande densité.

En somme, nous pouvons retenir de tout ceci que l'auteur ne croyait pas à une influence particulièrement grande des résistances individuelles naturelles, qu'il envisageait la possibilité de la *formation artificielle d'individus résistants dans les conditions de l'essai*, et qu'enfin, tout au moins dans le cas des désinfectants chimiques, il attribuait un rôle prépondérant à l'existence de substances protectrices et à la diminution de concentration de la substance désinfectante dans le milieu. Ces substances protectrices étaient d'autant plus abondantes, et la fixation du désinfectant était d'autant plus forte que le nombre de germes présent était plus élevé.

Au point de vue pratique, Lange était ainsi amené à des conclusions différentes de celles de ses prédécesseurs. Ces derniers, cherchant à rendre particulièrement nombreuses les formes résistantes, avaient préconisé l'emploi de grandsensemencements. B. Lange, au contraire, émit l'idée qu'il fallait se défier d'ensemencements trop abondants. D'après lui, « par l'augmentation artificielle de résistance des germes, par suite de l'accumulation de certaines substances bactériennes dans les suspensions épaisses, ou par diminution de concentration du désinfectant par adsorption sur les bactéries, on arrive à une trop grande résistance des germes, ou à une action trop défectueuse du désinfectant, pour qu'elle corresponde à la réalité. Dans la méthode des suspensions particulièrement, toutes les conditions de ce genre, arrêtant la désinfection et liées à des hasards, doivent être évitées si l'on veut obtenir une valeur exacte et comparable de l'action des divers désinfectants ».

Comme ensemencements raisonnables, B. Lange proposa les proportions suivantes :

Pour 6 centimètres cubes de solution désinfectante, III gouttes d'une émulsion faite avec 10 centimètres cubes d'eau par tube de culture sur gélose. Repiquer 1/120 des germes ensemencés.

Cette opinion ne fut pas approuvée sans restriction par tous les auteurs, et M. Hahn (1922), particulièrement, se déclara partisan, malgré les objections de B. Lange, de la mise en expérience des grandes quantités de bactéries. Nous verrons plus loin ce qu'il faut entendre par grandes quantités de germes, et si vraiment les quantités préconisées par B. Lange, sans qu'il ait d'ailleurs donné de déterminations précises quant au nombre, peuvent être considérées comme de petites quantités.

Cette question de l'accroissement de résistance des germes, par augmentation de la densité de leur émulsion, a été examinée encore par d'autres auteurs qui ont mis en discussion les faits mêmes signalés par les précédents bactériologistes.

Nous n'insisterons pas ici sur les travaux qui traitent plus spécialement de l'action désinfectante de la chaleur. Il est bien évident que l'on ne saurait appliquer à la désinfection par les agents chimiques les raisonnements qui sont permis au sujet de l'action de cet agent physique. Nous ne ferons donc que citer ici les travaux de Göbel ⁽¹¹⁵⁾ (1923), Martin Behrens ⁽¹⁵⁾ (1923) et d'Ilückel ⁽¹⁴⁵⁾ (1926), relatifs à l'influence

de la quantité des germes présents, dans les essais de désinfection par la chaleur.

Notons enfin, pour terminer, que, pendant que se poursuivaient ces discussions, Liese et Mendel ⁽¹⁷⁹⁾, en 1923, attribuèrent uniquement l'influence exercée par le nombre des germes à la surface totale de ces germes. Pour ces auteurs, en effet, certains corps désinfectants, et particulièrement ceux qui appartiennent au groupe des sels métalliques, agissent par adsorption, c'est-à-dire que la surface sur laquelle ils peuvent se fixer exerce sur leur action une influence prépondérante. Après avoir effectué de nombreux essais, en mettant en jeu des solutions d'azotate d'argent et diverses surfaces bactériennes, les auteurs proposèrent de déterminer, au début des essais de désinfection, non seulement le nombre, mais encore la surface des bactéries utilisées. Ils proposèrent comme concentration optima, pour les essais de désinfection, des émulsions bactériennes contenant par centimètre cube un nombre de germes représentant une surface totale de 200 centimètres carrés au centimètre cube.

De ces travaux brièvement examinés, il ressort indiscutablement que le nombre des germes mis en expérience influe sur les résultats de la désinfection.

Il ne nous semble pas inutile, avant d'aborder à notre tour l'étude de ce problème, de donner une vue d'ensemble sur la question. Ceci nous permettra peut-être de mieux comprendre les controverses que nous venons de relater.

Si nous faisons agir sur une quantité donnée de microbes un agent stérilisant quelconque toujours pris en excès, et si nous suivons son action par numérations successives des germes survivants, nous constatons que tous les germes ne sont pas tués en même temps et que la stérilisation du milieu exige toujours un certain laps de temps. Ce fait, qui peut sembler évident *a priori*, est extrêmement important.

Pour l'expliquer, les uns ont compris l'action désinfectante comme une sorte de combinaison chimique où la combinaison molécule à molécule demande toujours une certaine dépense de temps. Nous retrouvons là l'idée de la loi de destruction logarithmique exposée par Miss Chick et par Madsen et Nyman.

Une deuxième hypothèse est qu'il existe, dans une souche en apparence homogène, des individus microbiens qui sont, par leur nature même, plus résistants que d'autres. A première vue, cette hypothèse peut paraître peu satisfaisante. En effet, les différences qui existent entre les individus d'une même espèce, animale ou végétale, ne sont jamais si considérables qu'elles se traduisent par d'énormes différences de résistance. Or, dans le cas des bactéries, nous observons des différences de résistance tout à fait considérables. Reprenons, par exemple, les résultats expérimentaux de Miss Chick. Si, contrairement à cet auteur, nous ne les expliquons que par des questions de résistances, nous verrions que certains individus d'une même souche sont tués en 2 minutes 15 secondes, alors que d'autres résistent pendant 34 minutes 30 secondes à la même action.

Cette différence surprenante entre germes voisins, issus de la même souche, non différenciables du point de vue morphologique, peut être

cependant considérée comme possible, en tenant compte de la faculté étonnante que possèdent les microbes, en général, de s'adapter aux conditions défavorables, et de transmettre, parfois pendant de nombreuses générations, ces caractères acquis à leurs descendants.

Enfin, un deuxième fait a encore été mis en évidence. Non seulement les germes ne sont pas tous tués au même instant, mais plus ils sont nombreux, plus ils résistent à l'action désinfectante.

Ce dernier fait pouvait être déduit directement du premier fait énoncé, en se basant soit sur la première, soit sur la deuxième hypothèse émise pour l'expliquer. Dans le premier cas, la réaction ayant à mettre en jeu des molécules plus nombreuses, sa durée se trouverait naturellement prolongée.

Dans le deuxième cas, les grandsensemencements apportant évidemment plus de formes résistantes auraient plus de chance d'apporter des formes encore plus résistantes.

En dehors de ces considérations, les auteurs se trouvèrent encore en face d'une nouvelle complication : la nécessité de considérer l'épaisseur de l'émulsion, ou « densité microbienne ».

Pour comprendre ces faits complexes, les différents auteurs donnèrent des interprétations contradictoires, les uns rapportant les résultats observés à la présence, dans le milieu d'essai, de substances protégeant les bactéries contre les antiseptiques, les autres admettant l'existence de substances nuisibles pour les bactéries, inhibitrices de la poussée microbienne,

Pour nous, nous ne chercherons pas à entrer dans cette controverse, cependant intéressante. Notre but étant, comme nous l'avons déjà spécifié, envisagé uniquement du point de vue pratique, nous voulons seulement chercher si nous obtenons, pour une substance chimique antimicrobienne quelconque, la même dose antibiotique, lorsque nous la faisons agir sur des quantités différentes de germes, contenues dans un même volume de liquide.

Les auteurs précédemment cités faisaient varier le nombre des germes mis en expérience et cherchaient le temps nécessaire, à une dose déterminée du désinfectant, pour tuer tous les germes présents. Ou bien ils suivaient l'action d'une dose déterminée de l'antiseptique en cherchant, à des temps donnés, le nombre des germes survivants. Pour nous, nous allons fixer un temps commun à tous nos essais, fixer, pour chacun de ces essais, des nombres différents de germes, et, en faisant varier les doses de substance antiseptique agissantes, nous allons déterminer la plus faible dose antiseptique (dose antibiotique) capable de tuer les germes dans le temps fixé.

Nous verrons ainsi si la dose antibiotique se modifie suivant le nombre des germes mis en expérience, et si l'influence du nombre des germes est suffisamment grande pour que nous devions en tenir compte. Nous examinerons, ensuite, si cette influence se manifeste de façon régulière et égale pour chaque groupe de désinfectants. Enfin, nous basant sur les résultats que nous aurons obtenus, nous essayerons de déterminer la quantité de germes qui convient le mieux pour que nos essais puissent avoir une valeur générale.

ESSAIS PERSONNELS

Pour rechercher dans quelle mesure la dose antibiotique d'une substance, c'est-à-dire la dose nécessaire et suffisante pour détruire en un temps donné des germes d'une espèce donnée, dépend du nombre de germes mis en présence de cette substance, nous avons effectué l'essai suivant :

Nous avons déterminé les doses antibiotiques de trois substances chimiques prises comme types (phénol, sublimé, iode), en les faisant agir durant un quart d'heure, à une température de 20° C., sur des émulsions bactériennes chaque fois différemment concentrées en germes. Les suspensions microbiennes utilisées pour ces essais contenaient respectivement par centimètre cube (après addition de la solution désinfectante) :

10 millions de germes.		
100	—	—
500	—	—
1 milliard	—	—
10	—	—

Ces suspensions étaient titrées avec exactitude avant l'essai, selon la technique décrite au chapitre suivant. La technique utilisée pour chaque détermination de dose antibiotique était la technique ultérieurement décrite (technique directe).

Pour chaque essai, après action de l'antiseptique, une quantité constante de 1/10 de centimètre cube était prélevée dans le mélange : émulsion bactérienne-désinfectant, contenant 5 centimètres cubes de suspension microbienne, et était repiquée dans un bouillon de culture. L'épreuve de survivance des germes était donc effectuée sur la proportion constante du 1/50 des germes soumis à l'influence destructrice.

Les solutions désinfectantes, dont des quantités variables étaient ajoutées au milieu, étaient :

- 1° Une solution de phénol pur à 5 % ;
- 2° — — — sublimé à 1 % ;
- 3° Une solution iodo-iodurée contenant : 1 % d'iode et 2 % d'iodure de potassium.

Les résultats ci-dessous donnés représentent tous la moyenne de nombreux essais. Nous décrirons plus loin, en détail, les essais effectués pour déterminer ces chiffres.

TABLEAU VIII

INFLUENCE SUR LA DOSE ANTIBIOTIQUE, VIS-A-VIS DU *Staphylococcus aureus*, DE LA QUANTITÉ DE GERMES UTILISÉS.

Température : 20° C. ; temps de contact, 15 minutes ; milieu intermédiaire : eau distillée.

Antiseptiques.		Concentration en germes des émulsions.				
Doses antibiotiques en gr. par litre.	Phénol.....	10 millions par cm ³ .	100 millions par cm ³ .	500 millions par cm ³ .	1 milliard par cm ³ .	10 milliards par cm ³ .
		6,5	9,5	9,5	9,5	10,4
	Bichlorure de mercure.	0,075	0,15	0,15	0,30	
	Iode.....	0,003	0,003	0,020	0,025	0,075

Il ressort nettement des chiffres donnés dans ce tableau que la dose antibiotique dépend, dans une très large mesure, de la quantité des germes utilisés pour la déterminer.

Pour chacun des antiseptiques mis en expérience, la dose antibiotique se montre de plus en plus grande lorsque le nombre des germes mis en expérience augmente. Ceci correspond jusqu'à un certain point au fait, trouvé par les auteurs cités plus haut, que la durée de destruction augmente en proportion du nombre des germes.

Ces chiffres nous permettent, en outre, de constater deux autres faits :

Tout d'abord, l'augmentation de la dose antibiotique n'est pas régulière. Elle est, en général, beaucoup plus marquée quand l'augmentation des nombres porte sur les plus faibles quantités de germes. Par ailleurs, elle varie selon le désinfectant considéré. Ainsi, si nous comparons les diverses doses antibiotiques trouvées pour 10 millions, et pour 1 milliard de germes, par exemple, nous voyons que :

La dose antibiotique du phénol est montée de 6,5 à 9,5 (soit une augmentation de 46 p. 100) ;

La dose antibiotique du HgCl² est montée de 0,075 à 0,30 (soit une augmentation de 306 p. 100) ;

La dose antibiotique de l'iode est montée de 0,003 à 0,025 (soit une augmentation de 733 p. 100).

Nous pouvons donc dire que l'influence du nombre des germes sur les résultats de l'essai est bien différente selon la nature des substances désinfectantes considérées.

Ceci nous permet de constater, avec la plus grande netteté, que,

comme nous l'avons déjà dit, la méthode du « coefficient phénol » n'élimine aucunement, comme le pensaient les auteurs anglais, les erreurs inhérentes à la variation éventuelle des nombres de germes mis en expérience. Rappelons, à ce sujet, que ces auteurs n'effectuaient aucune détermination exacte du nombre des germes mis en jeu, mais se contentaient de mesurer très approximativement des volumes de cultures en bouillon.

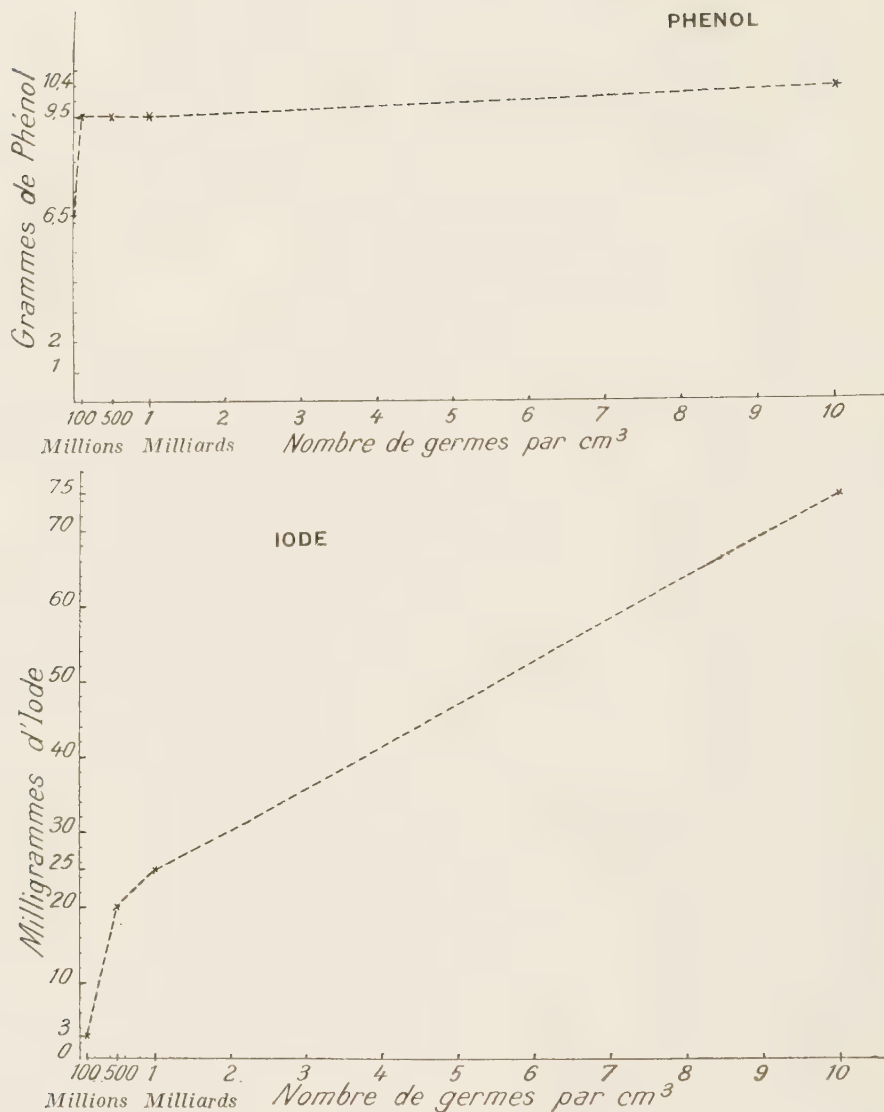
Remarquons, pour terminer, que l'absence du chiffre, dans notre tableau, en regard du bichlorure de mercure (essai avec 10 milliards de germes par centimètre cube), ne signifie pas que l'essai correspondant n'a pas été effectué. Il a, au contraire, été renouvelé de nombreuses fois. Mais les résultats trouvés au cours de ces différents essais étaient si différents que nous avons dû renoncer à en tirer un chiffre moyen valable. Dans cet essai effectué avec une forte concentration en germes, le bichlorure de mercure s'est donc montré comme un antiseptique irrégulier. Les essais ultérieurs nous montreront encore plus nettement combien ce corps est particulièrement sensible aux moindres variations expérimentales (modifications physiques ou chimiques du milieu, etc...). Nous verrons spécialement combien il est sensible aux plus faibles variations du contenu du milieu d'essai en substances protidiques.

Il est donc possible de supposer que l'irrégularité des résultats, obtenus avec une très forte concentration en germes (10 milliards par centimètre cube), est due au transport, en même temps que les germes, dans le milieu d'essai, de substances albuminoïdes, entraînées en quantités variables par les bactéries. Étant donnée la technique adoptée pour préparer nos émulsions microbiennes nous ne pensons pas que ces substances proviennent du milieu de culture. Nous sommes plutôt portée à croire qu'il s'agit de substances produites par les bactéries elles-mêmes, ou bien de corps bactériens morts.

L'influence, sur la dose antibiotique d'une substance, de la variation du nombre de germes utilisés pour la déterminer étant nettement mise en évidence, il nous reste maintenant à fixer, en nous aidant de nos chiffres et des données apportées par les autres auteurs, la concentration en germes que nous retiendrons finalement pour nos essais.

Du point de vue pratique, il nous semble devoir agir sur des masses microbiennes assez considérables. En effet, les contaminations naturelles sont généralement occasionnées par un nombre assez grand de microbes, et, par ailleurs, la pullulation des germes, soit dans les organismes des animaux malades, dans les excréta de toutes sortes, soit dans la nature (eaux, immondices, etc...), offre à la désinfection des masses microbiennes assez denses. Il n'y a donc, du point de vue pratique, aucune autre limite de nombre que celle expérimentalement utilisable.

Du point de vue théorique, tel que nous l'avons examiné, nous devons envisager la possibilité de l'existence, antérieure ou postérieure au contact de l'antiseptique, de formes beaucoup plus résistantes que d'autres. Or, si celles-ci, comme il est vraisemblable, sont relativement peu nombreuses, nous devons encore choisir pour l'essai un grand nombre de germes. C'est la conclusion à laquelle sont arrivés Hailer, M. Hahn, etc. Mais nous avons vu que d'autres auteurs (Lange, Reichen-



bach) ont pensé que les germes pouvaient présenter des résistances individuelles plus grandes du simple fait qu'ils sont accumulés en masses plus importantes.

Pour éviter l'influence de tels facteurs liés à des conditions extrinsèques, nous devons donc éviter l'emploi de suspensions par trop concentrées, cette concentration devant, cependant, rester suffisante pour assurer la présence d'un nombre assez grand de bactéries résistantes.

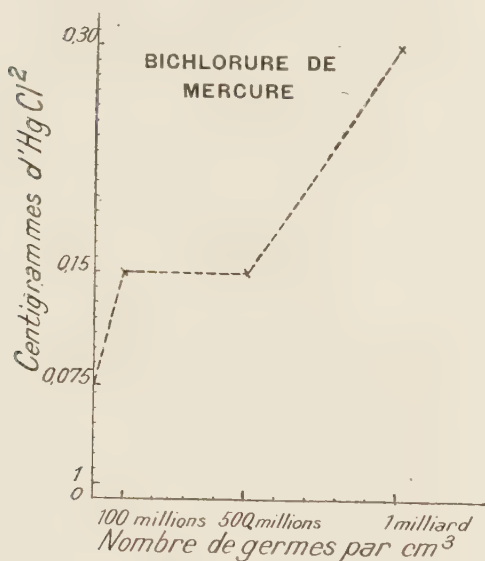


Fig. 3. — Influence du nombre des germes sur la détermination de la dose antibiotique. (Milieu d'essai : eau distillée. Germes : staphylocoques dorés.)

Nous devons encore être guidée dans notre choix par le souci de repiquer dans le milieu de subculture un nombre convenable des germes qui ont été traités. Comme dans l'essai lui-même, ce nombre doit entraîner dans la subculture suffisamment de germes résistants. Mais cette quantité repiquée doit être d'un volume assez restreint pour ne pas entraîner en même temps une quantité de substance antiseptique susceptible d'arrêter le développement, dans la subculture, des germes restés vivants, ce qui entraînerait une détermination erronée de la dose antibiotique.

Si nous considérons les courbes ci-dessous, qui illustrent les résultats du tableau VII, nous voyons qu'elles présentent une montée rapide, quand on passe de la concentration en germes de 10 millions à celle de 500 millions. Elles présentent ensuite une ascension moins marquée. Dans le cas particulier du phénol, cette ascension secondaire, plus faible, se voit déjà à partir de la concentration de 100 millions de germes. Dans le cas du sublimé, nous observons un palier entre les concentrations de 100 et de 500 millions. Dans le cas de la solution iodo-iodurée, l'augmentation de la concentration en germes de 10 à 100 millions ne semble pas influencer la dose antibiotique. Par contre, la dose antibiotique est considérablement augmentée lorsque l'on passe de 100 à 500 millions de germes par centimètre cube, et elle augmente encore, bien que moins brusquement, lorsque la concentration continue à augmenter.

Dans le choix de la concentration à utiliser pour nos essais, nous avons jugé utile de dépasser les concentrations pour lesquelles la stérilisation est obtenue, trop facilement, avec des doses faibles de substances anti-

septiques. Ces concentrations n'assurent, en effet, peut-être pas l'existence de formes résistantes. Nous avons donc admis comme chiffre de base, pour l'essai antibiotique, *500 millions de bactéries par centimètre cube* d'émulsion. Ce chiffre correspond approximativement, pour 10 centimètres cubes de mélange désinfectant, à X gouttes d'une émulsion mère faite avec 10 centimètres cubes d'eau par tube de culture sur gélose. C'est là, approximativement, la concentration préconisée par B. Lange.

L'émulsion ainsi obtenue présente une opacité nette. Le chiffre choisi nous offre le grand avantage de permettre une prise facile de 50 millions de germes, 1/10 de centimètre cube étant, à notre avis, la plus petite quantité que nous puissions mesurer de façon facile et exacte à la fois. C'est, en effet, cette quantité de 50 millions de germes que nous avons coutume de repiquer dans 5 centimètres cubes de bouillon quand nous effectuons les subcultures. Nous obtenons ainsi, dans nos subcultures, une concentration en germes de 10 millions par centimètre cube, qui est précisément celle que nous utilisons pour nos essais antigénétiques.

En résumé, le nombre de germes choisi pour l'essai antibiotique (*500 millions par centimètre cube*), suffisamment grand, nous permet de transporter facilement dans les subcultures le nombre même de bactéries qui nous sert à déterminer le pouvoir antigénétique. Ayant pris soin d'utiliser pour les subcultures le même milieu et les mêmes conditions que pour les mesures antigénétiques, il nous est possible de comparer directement la dose d'antiseptique transportée dans la subculture à la dose antigénétique de la substance. Ceci nous permet de vérifier, dans chaque cas, la validité de nos essais, ce qui est, comme nous le verrons plus loin, de toute nécessité.

B. — Facteurs dépendant des qualités de l'organisme utilisé pour l'essai de désinfection.

Nous allons aborder maintenant une question très importante : celle de l'influence que peuvent exercer sur les résultats de la désinfection les modifications inhérentes à la qualité des germes.

A ce point de vue, les germes utilisés peuvent varier de plusieurs façons :

- 1^o Ils peuvent être d'*espèce différente* ;
- 2^o Étant de même espèce, ils peuvent provenir de *souches différentes* ;
- 3^o Étant pris sur une souche déterminée d'une espèce donnée, ils peuvent être d'*âge différent*.

Les influences exercées sur l'essai de désinfection par ces divers facteurs sont, évidemment, d'intensité inégale, et l'on peut logiquement prévoir qu'elles doivent s'atténuer en passant du premier au troisième terme. Cependant, le simple fait de prendre comme germes d'essai des germes prélevés sur des tubes de culture différents, ou à des moments différents, entraîne, bien que ces germes soient de même origine, des

modifications nettes dans les résultats. Nous sommes donc dans l'obligation de définir non seulement l'espèce, la race, l'origine des germes utilisés, mais aussi toutes les conditions qui interviennent dans l'entretien d'une culture, et également l'âge de celle-ci.

Nous allons examiner, tout d'abord, l'influence exercée sur l'essai de désinfection, par l'espèce microbienne choisie.

1^o INFLUENCE DE L'ESPÈCE BACTÉRIENNE

Le processus de désinfection ne se fait pas d'une façon identique lorsqu'il s'adresse à des espèces bactériennes différentes. En effet, les diverses espèces sont loin de présenter la même sensibilité vis-à-vis des diverses substances antimicrobiennes, et il existe pour ces substances, comme pour beaucoup d'autres agents thérapeutiques, une « spécificité », parfois très marquée, vis-à-vis d'une espèce bactérienne déterminée.

Ce fait a été reconnu depuis longtemps. Dès 1875, Davaine ⁽⁷⁰⁾, puis R. Koch ⁽¹⁶⁰⁾ et, plus tard, vers 1888, Martens ⁽¹⁹²⁾ et Novy ⁽²⁰⁷⁾ en donnèrent des exemples. Il est inutile que nous citions ici tous les travaux relatifs à ce sujet ; nous nous bornerons à donner quelques exemples :

En 1905, Rodet ⁽²⁵⁹⁾ constata que le staphylocoque était beaucoup plus résistant que le bacille d'Eberth à l'action bactéricide du savon blanc. Walker ⁽³⁰¹⁾ signala que le bacille typhique, de son côté, était plus résistant, à la même action, que le pneumocoque et le streptocoque.

Hamilton ⁽¹²⁸⁾, en 1916, donna les différents « coefficients phénol » que présentait un désinfectant commercial du groupe du crésol, vis-à-vis de diverses espèces bactériennes. Il obtint les résultats suivants :

<i>Pasteurella pestis</i>	40
<i>Corynebacterium diphtheriæ</i>	30
<i>Bacterium entericus</i>	20
<i>Bacterium coli</i>	17
<i>Vibrio cholerae</i>	42

En 1921, Tilley ⁽²⁹⁴⁾ obtint, comme valeurs du coefficient phénol de la chloramine T, les chiffres suivants :

Sur le staphylocoque doré.....	92
— bacille typhique.....	66
— <i>Pseudom. æruginosa</i>	8

Schneider (1916), critiquant l'emploi du bacille typhique pour la mesure des « coefficients phénol », montra que cet organisme était particulièrement sensible aux substances antiseptiques à base de goudron. Les coefficients obtenus avec cet organisme étaient donc trop élevés. Il montra que le bacille pyocyanique, très peu sensible, par contre, aux propriétés antigénétiques des produits à base de goudron, donnait,

inversement, les coefficients phénol les plus bas. Il obtint ainsi, avec le phénol brut : le coefficient phénol 5 sur le bacille typhique ; 1,5 sur le bacille pyocyanique, — et, avec le crésol très pur : 12,5 sur le bacille typhique ; 3 sur le bacille pyocyanique ; 6 sur le colibacille ; 11,3 sur le bacille diphtérique.

Zöller et Eaton (³¹⁴), en 1923, trouvèrent, pour l'hypochlorite de soude, les coefficients phénol suivants :

Sur le <i>Mycob. tuberculosis</i>	42,8
— <i>Bact. alcaligenes</i>	100
— <i>Bacillus anthracis</i>	160
— <i>Bact. napolitus</i>	200
— <i>Neisseria gonorrhoea</i>	280
— <i>Proteus vulgaris</i>	330

Ces divers exemples montrent combien est variable, selon le germe utilisé, le résultat de l'essai de désinfection.

Le fait fut mis en évidence de façon encore plus nette par des essais effectués sur des substances colorantes.

En 1918, Eisenberg (⁹⁰), étudiant les relations entre les effets toxiques de divers ions et la nature des organismes utilisés, constata que, si les antiseptiques se comportaient de façon différente vis-à-vis des divers micro-organismes, il était cependant possible de classer ces derniers en deux séries, dont chacune groupait les organismes réagissant sensiblement de la même façon. Or, l'une des séries groupait les organismes prenant la réaction de Gram, et, l'autre, les germes qui ne la prenaient pas. De ses expériences, l'auteur put conclure que, d'une façon générale, les germes prenant la réaction de Gram étaient environ 10.000 fois plus sensibles à l'action inhibitrice des colorants employés que ceux ne la prenant pas.

Ces résultats furent confirmés par différents auteurs, parmi lesquels Oberstadt (²⁰⁹), Krumiedt (¹⁶⁵), Friedler (¹⁰⁵), Watson (³⁰³), Retter (²⁴⁸), Plastringe et Walley (²³⁶) (1929).

Bridré (³⁴), en 1921, étudia particulièrement, à ce point de vue, l'action antigénétique de quelques couleurs d'aniline et confirma la plus grande sensibilité des bactéries prenant la réaction de Gram. Il put constater l'efficacité sur ces dernières de dilutions excessivement grandes, atteignant un millionième pour des colorants tels que le bleu de méthylène, le violet de benzyle, le vert brillant, le violet hexaméthylé, etc...

Bechold (¹¹), de son côté, avait noté (1909) cette plus grande sensibilité des germes prenant la réaction de Gram, vis-à-vis des composés halogénés du naphthol. Il trouva notamment les chiffres suivants en travaillant parallèlement sur le bacille diphtérique et sur le colibacille :

CONCENTRATION MINIMA NÉCESSAIRE POUR TUER

	<i>B. diphtérique</i>	<i>B. coli communis</i>
Lysol	1/20.000	1/800
B. Naphtol	1/10.000	1/8.000
Monobromo-B.-naphtol	1/10.000	1/8.000
Dibromo —	1/40.000	1/30.000
Tribromo —	1/400.000	1/1.000
Tétabromo —	1/200.000	1/500
Pentabromo —	1/150.000	1/100

Ces résultats montrent que l'addition d'atomes de brome entraîne une diminution nette de toxicité vis-à-vis du colibacille, et, au contraire, une augmentation sensible du pouvoir désinfectant vis-à-vis du bacille diphtérique. Ceci est donc un nouvel exemple de l'influence marquée de l'espèce bactérienne.

Citons encore les travaux de Morgenroth ⁽²⁰⁰⁾, qui montra que les dérivés de la quinine (optochine, vuzine, eucupine), exercent une action désinfectante très variable selon les germes. Le tableau suivant, donné par l'auteur, en est un exemple.

DILUTIONS DE CERTAINS DÉRIVÉS DE LA QUININE NÉCESSAIRES POUR
TUER DIFFÉRENTS ORGANISMES (d'après MORGENROTH)

	B. diphteriae.	B. tetani.	Streptoc.	Staphyloc.	Pneumococcus.
Chl. optochine (chl. éthylhydrocupréine)	1/400	1/2.500	1 —	1/500	1/400.000
Chl. eucupine (chl. isamylhydrocupréine).....	1/2.000	1/20.000	1/40.000	1/8.000	1/20.000
(Chl. vuzine (chl. iso-octylhydrocupréine).....	1/8.000	1/60.000	1/80.000	1/6.000	

Il faut remarquer que tous les germes mis en expérience par Morgenroth appartiennent au groupe des bactéries prenant la réaction de Gram.

Un certain nombre de travaux, effectués à la même époque, et parfois par les auteurs mêmes que nous avons cités, ont tenté d'expliquer pourquoi les diverses bactéries réagissaient différemment aux substances antiseptiques. Nous n'avons pas l'intention d'approfondir ce point particulier qui nous entraînerait à étudier, du point de vue théorique, le problème de la désinfection. Nous nous bornerons à signaler les essais de Cooper et Tornster (1924).

Ces auteurs ont émis l'hypothèse que l'action désinfectante sélective reposait sur des différences dans le mode d'action des substances germicides. Ils pensaient ainsi que l'action particulièrement forte exercée par l'alcool et le phénol sur le bacille pyocyanique est due à ce que ces antiseptiques agissent de façon particulière sur l'état colloïdal de la bactérie. Inversement, la résistance relativement grande du bacille pyocyanique à d'autres désinfectants, tels que les métaux lourds, serait due au fait que ces désinfectants ne peuvent pas exercer cette même action spécifique sur les colloïdes protoplasmiques. L'auteur envisageait des modes d'action très différents pour les divers désinfectants, les uns de nature chimique, les autres plus spécialement physiques.

Pour Eisenberg, l'action sélective des substances colorantes pour les germes prenant la réaction de Gram était due à ce que ces germes sont adsorbés beaucoup plus rapidement par le charbon animal que les germes « Gram négatifs ». Pour cet auteur, c'est donc l'état physique différent qui entraîne le comportement différent de ces germes.

Nous aurons l'occasion d'étudier ailleurs de plus près ces travaux et ceux qui les ont suivis. Nous ne donnons ces deux exemples que pour montrer dans quel sens il convient de chercher les causes des phénomènes mis en évidence.

Il nous semble inutile d'insister davantage sur cette influence, bien connue, de l'espèce microbienne sur l'action désinfectante. On sait qu'elle est employée journellement dans la pratique bactériologique pour séparer des espèces voisines (différenciation des espèces qui composent le groupe typhique-colibacille-dysentérique, etc...). On sait, d'autre part, que les récents travaux de chimiothérapie s'orientent vers une destruction sélective des agents pathogènes (traitement des septicémies par les substances colorantes du type acriflavine, traitement de la lèpre par les principes actifs de l'huile de Chaulmoogra, etc...).

Au point de vue qui nous intéresse ici particulièrement, il résulte des faits cités que les mesures des actions antiseptiques doivent être effectuées sur le plus grand nombre possible d'espèces bactériennes, tout au moins sur les germes susceptibles d'être détruits, en pratique, par le désinfectant étudié. C'est là la conclusion à laquelle sont arrivés les derniers auteurs qui ont préconisé l'emploi des méthodes du « coefficient phénol », alors que le *Rideal Walker Test* initial ne comportait qu'un seul essai sur le bacille typhique.

Pour donner à l'essai une valeur pratique générale suffisante, il convient, pour le choix des germes devant servir à l'essai, de s'adresser aux représentants des divers groupes d'agents infectieux, susceptibles d'être rencontrés dans la nature, comme l'a déjà mentionné Reddish.

En dehors d'une destination absolument précise du désinfectant étudié, il convient, à notre avis, de choisir comme germes d'essai :

1° Un germe sporulé, de résistance toujours très supérieure, comme on le sait, à celle des formes végétatives. On peut, dans ce cas, choisir les formes sporulées du bacille du charbon, ou, afin d'éviter les risques de contamination, d'un germe non pathogène, tel que le *Bacillus subtilis* ;

2° Un représentant du groupe des germes pyogènes : le *staphylocoque*. Toutefois, si l'on a affaire à un désinfectant qui doit être utilisé en chimiothérapie, il conviendra de s'adresser au streptocoque, et à un streptocoque particulièrement hémolytique ;

3° Un germe du groupe des *bacilles typhiques* ;

4° Un germe du groupe des bacilles de la *diphthérie*, et particulièrement un bacille long.

5° Le *bacille tuberculeux* ;

6° Un germe *anaérobie*, le vibron septique par exemple (1).

Il serait évidemment possible d'allonger cette liste, en vue d'obtenir

(1) Il convient, évidemment d'utiliser, pour chacune de ces espèces, les milieux de culture les plus favorables. Ainsi, le bouillon peptoné salé sera utilisé pour l'entretien et les subcultures du *Bacillus subtilis*, du staphylocoque, et du colibacille. Dans le cas du bacille diphthérique, on ajoutera à ce bouillon un peu de liquide d'ascite. Le bacille tuberculeux, sur lequel nous n'avons pas encore expérimenté, pour notre part, devra être repiqué sur des milieux spéciaux (milieu de Pétroff, par exemple), et l'essai sur ce germe sera effectué en présence d'une grande quantité d'albumine. Les bacilles anaérobies pourront être cultivés en bouillon au cœur de bœuf, et le contact de ces germes avec le désinfectant sera effectué à l'abri de l'oxygène.

Il faut enfin éviter, autant que possible, d'utiliser des germes difficiles à cultiver ou à conserver en cultures, afin de se mettre à l'abri des erreurs d'interprétation dans les résultats.

des renseignements plus complets sur la substance étudiée. Cette liste nous semble cependant suffisante pour l'usage général.

Notons, pour terminer, que, pour garder une valeur générale, l'essai ne doit pas atteindre une trop grande complexité, et, toutes les fois qu'il est possible de le prévoir, l'essai doit s'adresser aux germes mêmes pour la destruction desquels le désinfectant est destiné.

20 INFLUENCE DE LA SOUCHE BACTÉRIENNE : RÉSISTANCE DIFFÉRENTE DES DIVERSES SOUCHES D'UNE MÊME ESPÈCE BACTÉRIENNE. — MILIEUX DE CULTURE ET DE CONSERVATION DES SOUCHES.

De même qu'il existe des souches virulentes et avirulentes d'une même espèce, il existe également des souches douées, selon leur origine, d'une résistance naturelle plus ou moins élevée. A côté de cette résistance *naturelle* variable, il existe également, entre les diverses souches, des résistances *acquises* au cours de leur conservation, résistances liées, dans une large mesure, aux conditions plus ou moins favorables offertes par les milieux de culture utilisés dans ce but.

Ces faits ont été constatés depuis longtemps, et nous en trouvons déjà mention dans le travail de Grüber ⁽¹²⁹⁾ (1891), ainsi que dans ceux d'Heider ⁽¹³²⁾ (1891-1892), de Krönig et Paul ⁽¹⁶⁴⁾ (1897), d'Otsuki ⁽²¹²⁾ (1899), de Dannapel ⁽⁶⁷⁾ (1889), de Weil ⁽³⁰⁴⁾ (1901), de Ballner ⁽⁸⁾, de Kokubo ⁽¹⁶¹⁾ (1903) et de Findel ⁽⁹⁹⁾ (1907).

Avant même tous ces auteurs, V. Esmarch et Fraenkel ⁽⁹⁵⁾ (1886-1889) avaient signalé que chaque souche de bacille du charbon possédait une résistance déterminée à l'action antiseptique, résistance particulière qu'elle conservait très longtemps et que l'on pouvait presque considérer comme une particularité de race.

En 1908, Schneider et Seligmann ⁽²⁷²⁾, essayant un antiseptique par la méthode des fils, sur diverses souches de staphylocoque, obtinrent des résultats totalement différents. Ainsi, en tenant compte du temps nécessaire à la destruction totale de la même quantité de germes, ils obtenaient, pour chaque souche, des temps totalement différents, comme en témoigne le tableau suivant :

Temps de destruction :	15 minutes.	30 minutes.	45 minutes.	60 minutes.
<i>Souches :</i>	—	—	—	—
S	+	+	+	—
K.....	+	—	—	—
M ¹	—	—	—	—
M ²	+	—	—	—
M ³	—	—	—	—
T.....	—	—	—	—

Zettvow ⁽³¹²⁾ (1912), Gegenbauer et Reichel ⁽¹¹⁰⁾ (1913), Süpfle et Dengler ⁽²⁸⁸⁾ (1916) s'occupèrent des variations de résistance des germes en fonction des conditions environnantes. Portier ⁽²²⁹⁾, en 1915, étudia

également la résistance à des agents chimiques de diverses races de *Bacillus subtilis*.

Citons encore les noms d'Eckelmann ⁽⁸⁶⁾ (1918), Reiter (1920), Seligmann ⁽²⁷⁶⁾ (1922), Gegenbauer ⁽¹⁰⁹⁾ (1922) (qui, au cours d'essais de désinfection par le sublimé, déterminait, avant chaque essai, la résistance au phénol de sa souche de staphylocoque), de Darany ⁽⁶⁹⁾ (1925), Gundel et Habs ⁽¹²²⁾ (1925), Magoon (1926) ⁽¹⁵⁹⁾.

Reddish (1925-1926) effectua des essais en série sur 24 souches différentes d'un même organisme : le staphylocoque, et put ainsi constater de grandes variations dans les résistances de ces diverses souches au phénol. C'est ce qui l'amena à proposer, pour tout essai de désinfectant, une détermination préalable de la résistance au phénol de la souche utilisée. Dans sa modification du *Rideal Walker Test*, il proposa, ainsi, de vérifier que les germes utilisés répondaient bien aux conditions suivantes :

Le bacille typhique utilisé devait présenter une résistance telle qu'il fût tué en 10 minutes, et non en 5 minutes, par une dilution de phénol à 1/90. Le staphylocoque doré devait être tué en 15 minutes, mais non en 5 minutes, par une dilution de phénol au 1/60. Le bacille diphtérique ne devait pas être tué en 5 minutes par une dilution de phénol au 1/100, ni en 15 minutes par une dilution au 1/120. Le streptocoque hémolytique ne devait pas être tué en 5 minutes par une dilution de phénol à 1/90, ni en 15 minutes par une dilution au 1/100. Le pneumocoque ne devait pas être tué en 5 minutes par une dilution de phénol au 1/100, ni en 15 minutes par une dilution au 1/120.

De son côté, Fischer ⁽¹⁰⁰⁾ (1928) conseilla de déterminer, dans un essai préliminaire, la résistance de la souche utilisée, et d'y adapter le temps d'action du désinfectant de façon à atteindre, même aux plus faibles concentrations, le maximum de résistance.

Récemment, Süpfle et Hoffmann ⁽²⁸⁹⁾ (1930) préconisèrent également un tel essai préliminaire de résistance des souches. « La suspension originale de la souche de colibacille utilisée était détruite après action, durant 10 minutes, d'une solution de phénol à 1,5 p. 100, et celle de staphylocoque après action de 25 minutes de cette même solution. »

D'après ces différents auteurs, la résistance des diverses souches d'une même espèce bactérienne est donc très variable. Nous verrons plus loin à quelle conclusion nous permettent d'aboutir nos travaux personnels.

Comme nous l'avons noté, il faut encore envisager, au sujet de ces résistances variables, l'influence exercée par :

Le mode de conservation des souches. — Nous verrons plus loin quelle influence peuvent exercer sur la vitalité des germes la richesse nutritive et les qualités de leur milieu de culture. Il est logique de penser que la résistance aux antiseptiques dépend ainsi, dans une large mesure, de la nature des milieux qui servent à l'entretien des souches, et des conditions dans lesquelles sont conservées ces souches.

En 1908, Miss Chick et J.-C. Martin ⁽⁵⁰⁾, au cours d'une longue étude sur les lois du processus de désinfection, purent observer que des souches cultivées depuis longtemps sur milieux artificiels présentaient une certaine perte de résistance vis-à-vis des substances antiseptiques, par

rapport à des cultures fraîchement isolées. Ils purent faire cette observation sur le bacille typhique et sur le staphylocoque.

Les auteurs constatèrent également que « l'histoire antérieure » de la souche modifiait de beaucoup sa résistance au phénol. Alors qu'une culture de bacille typhique, souvent repiquée et maintenue à 37° C., augmentait progressivement de résistance, une même souche cultivée à la température ambiante et conservée à la glacière présentait une sensibilité de plus en plus grande, bien que les cultures utilisées fussent toujours âgées de 24 heures, et cultivées à 37° C.

Aussi ces auteurs proposèrent-ils, pour maintenir les souches à un degré de résistance uniforme, de les conserver sur gélose inclinée, à la température ambiante (16° à 20° C.) et de repiquer les cultures tous les 15 jours environ.

Schneider et Seligmann, en 1923, constatèrent des faits analogues. Ils observèrent que la conservation sur des milieux gélosés différents modifiait de différentes façons la résistance des germes à un antiseptique. Ainsi, pour détruire une même quantité de staphylocoques, provenant d'ensemencements sur milieux gélosés différents, il fallait faire agir un désinfectant donné (lysol, 1 p. 100) durant 15 minutes dans certains cas, et durant 60 minutes dans d'autres cas, ce qui faisait donc une différence de durée d'action de 1 à 4.

Ces auteurs insistèrent, à la suite de ces observations, sur la nécessité d'utiliser toujours un même milieu de culture, au cours des essais de désinfection. Ils proposèrent, en outre, de repiquer les souches sur ces milieux tous les 15 jours au moins, et de conserver les cultures à la glacière, après un séjour relativement court de 24 heures à 37°.

Nous n'insisterons pas davantage sur ce point. Il est facile de comprendre qu'un *milieu de culture* défavorable par une quelconque de ses qualités (chimiques ou physiques, pH, etc...) puisse entraîner un lent dépérissement des germes qu'il nourrit. Ce fait est bien connu pour la conservation des souches pathogènes qui doivent être assez souvent replacées dans leur milieu originel (organisme vivant, généralement), pour retrouver toute leur virulence.

Il est tout aussi évident que la *température* à laquelle sont conservées les souches est susceptible d'influencer leur vitalité. Enfin, on peut encore concevoir facilement la possibilité d'une accoutumance progressive à certains produits plus ou moins nuisibles apportés par les éléments nutritifs mêmes du milieu, ou produits dans la culture par la multiplication des germes, ce qui entraîne la formation de souches bactériennes plus ou moins insensibles à certaines actions désinfectantes.

3° INFLUENCE DE L'AGE DE LA CULTURE UTILISÉE POUR L'ESSAI

Si l'on veut obtenir, au cours de divers essais de désinfection, des résultats réguliers, il ne suffit pas, toutes autres conditions étant maintenues égales, d'utiliser une même souche bactérienne conservée sur milieux identiques, repiquée à intervalles de temps connus, et mise à incuber

à la même température. Malgré toutes ces précautions, on risque encore de mettre en expérience des germes de vitalité variable, si l'on ne s'adresse pas à des germes de même âge, c'est-à-dire à des germes prélevés à un moment déterminé après l'ensemencement de la souche.

La question qui se pose ici est donc de savoir à quel stade du développement d'une culture il convient de prélever les germes à mettre en expérience, pour que ces germes présentent une stabilité de résistance maxima.

Pour résoudre cette question, nous avons fait appel aux travaux récents de Régnier et Kaplan ⁽²⁴⁰⁾ (1930). Ces auteurs, étudiant le cours de la multiplication bactérienne, en milieux liquides, à la fois par numération microscopique de la quantité totale des germes visibles et par numération des germes capables de se reproduire sur bouillon gélosé, ont noté que le rapport de ces deux quantités, correspondant en quelque sorte à un rapport de vitalité des micro-organismes considérés, était extrêmement différent, suivant les différents moments de la multiplication, non seulement pour des cultures provenant d'une même souche et faites dans les mêmes conditions, mais même pour une culture donnée prise à différentes périodes.

De ces travaux se dégagaient des données que nous avons songé à utiliser pour tenter d'obtenir une sorte de stabilisation de vitalité des germes utilisés pour nos essais.

Régnier et Kaplan, en effet, avaient montré en utilisant ce rapport :

$$\frac{\text{nombre de germes capables de se reproduire sur gélose}}{\text{nombre de germes visibles}},$$

et, en comparant un certain nombre de cultures faites dans les mêmes conditions :

1^o Que ce rapport subissait des variations régulières suivant les périodes de la vie microbienne ;

2^o Qu'il était possible d'obtenir des valeurs plus constantes de ce rapport, pour diverses cultures bactériennes, en s'adressant à des périodes déterminées de la multiplication. Ils avaient ainsi montré que, vers la 10^e heure de la culture, au moment où se termine la phase de « multiplication logarithmique », ce « rapport de vitalité » passait par un maximum, de valeur sensiblement constante pour les diverses cultures.

A notre point de vue, il pouvait donc sembler préférable de prélever les germes à mettre en expérience non pas à la 24^e heure de la multiplication microbienne, comme nous l'avions fait jusqu'alors, et comme le faisaient la plupart des auteurs, mais à une période moins tardive correspondant à une vitalité plus grande et plus régulière des germes.

Il nous sembla donc nécessaire d'effectuer des essais comparatifs de désinfection, en utilisant, d'une part, des germes prélevés à la 24^e heure de la poussée bactérienne et, d'autre part, des germes prélevés pendant l'évolution de la période logarithmique. Nous fûmes encore encouragés dans cette voie par l'examen de renseignements bibliographiques que nous avons retrouvés depuis :

Miss Chick et J.-C. Martin (1908) admettaient que les individus les plus jeunes d'une culture de bacille paratyphique étaient également les plus résistants aux substances désinfectantes.

Par ailleurs, Delcourt-Bernard ⁽⁷⁴⁾ (1926) préconisait, pour les essais de désinfection, l'emploi de deux souches d'âge différent (6 et 24 heures).

Enfin, Buchanan et Fulmer ⁽³⁶⁾ (1930), contrairement aux précédents auteurs, pensaient que les germes prélevés dans la phase logarithmique étaient plus sensibles aux substances antiseptiques que les germes prélevés à la 24^e heure.

Ces opinions contradictoires ne pouvaient que nous engager à poursuivre les essais que nous nous étions proposé d'effectuer et que nous allons examiner maintenant.

ESSAIS PERSONNELS

RELATIFS A L'INFLUENCE EXERCÉE SUR L'ESSAI D'UN DÉSINFECTANT PAR LA QUALITÉ DES GERMES MIS EN JEU.

Des différents points que nous venons de passer rapidement en revue, résulte la nécessité absolue d'éliminer, ou tout au moins d'atténuer, dans la mesure du possible, l'influence exercée sur les essais de désinfection par les variations des diverses qualités (espèce, souche, âge), des germes utilisés. Pour ceci, et dans le but précis de mieux définir les techniques que nous voulions mettre au point, nous avons effectué deux sortes de recherches. Laissant de côté l'influence, si évidente, du changement d'espèce bactérienne, dont nous trouverons, du reste, des exemples typiques au cours du troisième chapitre, nous avons voulu :

a) Chercher, à notre tour, si *diverses souches d'une même espèce* bactérienne, isolées fraîchement d'un organisme animal parasité, ou conservées depuis longtemps au laboratoire, présentaient les mêmes résistances à l'action antiseptique ;

b) Trouver *quelle période de la multiplication microbienne* présentait le maximum de garanties de stabilité. Pour cela, nous avons comparé l'action antiseptique sur des bactéries prélevées à la 24^e heure de la poussée et sur des bactéries prélevées vers la 5^e heure, soit en pleine période logarithmique de la poussée.

Ce sont les résultats de ces différents essais que nous allons examiner maintenant.

A. *INFLUENCE DE L'ORIGINE DE LA SOUCHE BACTÉRIENNE UTILISÉE, SUR LE RÉSULTAT DE L'ESSAI D'UN DÉSINFECTANT.* — Afin de voir jusqu'à quel point la détermination de la dose antibiotique est influencée par le changement de la souche bactérienne utilisée, nous avons effectué les essais suivants : nous avons déterminé, dans des essais en série, dans les conditions habituelles, les doses antibiotiques de trois antiseptiques choisis comme types : le bichlorure de mercure, l'iode (sous forme de solution iodo-iodurée de Lugol), et le phénol, en utilisant, pour ces essais, quatre différentes souches d'une même espèce bactérienne ; le staphylocoque doré. Les souches A, B et C étaient des souches appartenant à la collection des souches de la Faculté de pharmacie ; les trois souches

avaient été isolées du pus d'abcès incisés, les deux premières depuis deux à trois mois, la souche C depuis un an environ. Toutes ces souches étaient conservées en gélatine et repiquées journallement sur gélose pendant les trois jours qui précédaient la mise en essais. La souche de staphylocoque D était une souche isolée seulement trois jours avant l'essai, et provenant de l'incision d'un furoncle.

Nous ne donnons pas ici, en détail, la technique de détermination de la dose antibiotique, que nous exposons dans notre troisième chapitre. Rappelons seulement que les doses antibiotiques que nous donnons ici représentent les doses, en grammes, des substances étudiées, qu'il suffit d'ajouter à un litre d'eau distillée pour y tuer en un quart d'heure une quantité de staphylocoques correspondant à une concentration en germes de 500 millions par centimètre cube.

Ces doses sont données dans le tableau suivant. Les valeurs données représentent toutes la moyenne de 10 essais, pour chaque désinfectant et chaque souche bactérienne.

TABLEAU IX

Souches.	Doses antibiotiques, en eau distillée, vis-à-vis de diverses souches de <i>Staphylocoque doré</i> (grammes).		
	<i>Iode.</i>	<i>Bichlorure de mercure.</i>	<i>Phénol.</i>
A	0,010	0,141	11,78
B	0,013	0,148	12,87
C	0,015	0,15	11,25
D.....	0,019	0,067	12,25

Ces résultats nous permettent de constater qu'il n'existe qu'une bien faible différence de résistance entre les trois souches A, B, C, toutes trois isolées depuis un temps relativement long. Les différences obtenues sont, en effet, de l'ordre des variations expérimentales. Quant à la souche D, récemment isolée de l'organisme animal, si elle montre une résistance identique à celle des trois autres souches, vis-à-vis du phénol, elle manifeste une résistance différente vis-à-vis de l'iode et du bichlorure de mercure : il faut environ moitié moins de bichlorure de mercure et il faut un peu plus d'iode pour détruire cette souche que pour détruire les trois autres souches ; elle est donc moins résistance au bichlorure de mercure et un peu plus résistante à l'iode.

De ces résultats, nous ne pouvons tirer aucune conclusion bien nette. La seule observation qu'ils permettent de faire est que les souches conservées au laboratoire semblent posséder une plus grande régularité de résistance que les souches récemment isolées. C'est, d'ailleurs, là un fait logique, puisque ces souches sont accoutumées aux milieux de culture que l'on utilise pour les essais de désinfection. Il nous semble donc convenable de préconiser, pour la mesure des activités antimicrobiennes, l'utilisation de bactéries isolées depuis quelques semaines au

moins et habituées aux milieux de culture qui seront utilisés pour ces mesures.

Ceci nous amène donc à définir les *conditions de conservation* des souches utilisées pour les essais. Nous nous sommes conformée, à ce sujet, à la technique courante qui consiste, après un séjour de 24 heures à 37° C., à conserver les souches en gélatine solidifiée, à la température de la cave. Trois jours avant l'essai, ces souches sont placées à 37° C., puis réensemencées journellement sur bouillon gélosé incliné.

Notons enfin la nécessité de s'assurer, avant les essais, de la résistance suffisante de la souche utilisée, comme l'avait, rappelons-le, préconisé Reddish. Mais nous ne pensons pas devoir adopter, comme l'avait fait cet auteur, un essai de résistance des souches vis-à-vis du phénol. Au cours de nos essais, le phénol s'est, en effet, comporté comme un antiseptique par trop régulier, par trop indifférent aux variations expérimentales, pour que nous puissions le considérer comme un « étalon de résistance » suffisamment sensible. Pour essayer le degré de résistance de nos souches, nous nous sommes donc adressée à l'iode, corps bien connu, pur, facile à titrer, que nous croyons pouvoir conseiller dans ce but. Pour choisir la quantité minima d'iode à laquelle devait résister la souche essayée, nous nous sommes adressée aux résultats d'essais antibiotiques, effectués en série, que nous décrirons au troisième chapitre. Pour comprendre les raisons de notre choix, il suffit de consulter la courbe que ces résultats nous ont permis d'établir, courbe où sont portées en abscisses les doses antibiotiques de l'iode vis-à-vis du staphylocoque, obtenues dans les différents essais, et en ordonnées le nombre d'essais dans lesquels chacune de ces doses a été obtenue (fig. 7-Iode).

Dans cette courbe, nous constatons que la dose antibiotique obtenue dans le plus grand nombre d'essais est 0g,015 (la moyenne arithmétique étant 0g,013), et que les doses extrêmes obtenues sont 0g,009 et 0g,020.

Il n'existe donc qu'une faible différence entre les valeurs obtenues vis-à-vis des diverses souches examinées. Toutefois, le nombre des souches examinées ici est relativement restreint, et il est fort possible que l'on se trouve en présence de souches particulièrement résistantes ou sensibles. Aussi, croyons-nous qu'il est prudent, dans le cas de souches totalement inconnues, d'effectuer un essai préliminaire de résistance, et de ne conserver, pour les essais, que des souches de staphylocoque, vis-à-vis desquelles la dose antibiotique de l'iode (en solution iodo-iodurée), se trouve comprise entre 0g,010 et 0g,020.

Des essais effectués en série permettraient facilement d'établir la résistance que doivent présenter, à l'iode, les autres espèces bactériennes.

B. INFLUENCE DE L'ÂGE DES GERMES MIS EN EXPÉRIENCE SUR LES RÉSULTATS DE L'ESSAI D'UN DÉSINFECTANT. — Afin de déceler l'influence exercée sur la détermination de la dose antibiotique par l'âge des germes mis en expérience, nous avons effectué des essais antibiotiques avec trois désinfectants choisis comme types, vis-à-vis de germes appartenant à une souche déterminée d'une espèce bactérienne, germes prélevés à différents moments du développement microbien. (Rappelons

que nous appelons *dose antibiotique* la dose, en grammes, d'une substance, qu'il suffit d'ajouter à un litre d'un milieu déterminé pour tuer, en un temps donné, une quantité connue de germes.) Nous avons effectué ces essais sur des germes prélevés à la 5^e heure de leur culture (période de multiplication logarithmique), et sur des germes prélevés à la 24^e heure de leur culture (période habituellement choisie pour prélever les germes). La technique utilisée pour ces essais de pouvoir antibiotique était notre technique habituelle, technique que nous décrirons en détail au chapitre suivant. Nous avons dû, cependant, pour réaliser les conditions particulières des essais, faire subir à notre technique quelques modifications en ce qui concerne la suspension bactérienne. Nous exposerons plus loin le détail de ces modifications.

PROTOCOLE DES ESSAIS. — *Les désinfectants* choisis comme types pour effectuer ces essais ont été : le bichlorure de mercure, en solution aqueuse à 1 p. 1 000 ; le phénol en solution aqueuse à 5 p. 100 ; la solution iodo-iodurée de Lugol contenant 1 p. 100 d'iode.

L'*organisme utilisé* était la souche C de staphylocoque doré, provenant de la collection des souches de la Faculté de pharmacie. Cette souche, conservée sur gélatine, était repiquée journellement sur gélose pendant les trois jours précédant les essais.

Nous allons donner quelques détails sur la façon dont nous avons été obligée d'agir pour obtenir le nombre voulu (500 millions par centimètre cube) de germes développés après une multiplication de 5 heures seulement. Nous verrons plus loin, quand nous exposerons notre technique habituelle, pour laquelle nous utilisons des germes âgés de 24 heures, que nous prélevons les germes sur des géloses ensemencées depuis 24 heures et placées pendant ce temps à l'étuve à 37°. Il nous suffit, après avoir fait une émulsion concentrée de ces germes, de les compter et de diluer suffisamment l'émulsion pour avoir finalement le nombre voulu de bactéries. Mais, dans le cas présent, nous ne pouvons pas agir de même : en effet, 5 heures après l'ensemencement sur bouillon gélosé et le séjour, pendant ce temps, à 37°, les colonies microbiennes sont encore trop peu développées pour que nous puissions en faire une émulsion suffisamment concentrée en germes. Nous avons donc été obligée de prélever ces germes, âgés de 5 heures, non plus sur un tube de gélose inclinée, milieu solidifié, où la multiplication est relativement lente, mais dans un bouillon de culture liquide, où la multiplication microbienne se fait beaucoup plus rapidement. De ce fait, nous rencontrons deux difficultés :

1^o L'émulsion microbienne allait contenir, puisqu'elle provenait d'un bouillon de culture, une certaine quantité de substances supplémentaires, en particulier des albumines, susceptibles de gêner ou de modifier l'action antiseptique. Pour tourner cette difficulté, nous avons été amenée, d'une part, à prendre, comme milieu de culture, non pas le bouillon peptoné salé, mais une simple macération aqueuse stérile de viande de bœuf, qui apportait dans le milieu une moindre quantité de substances étrangères. D'autre part, pour qu'une comparaison exacte fût possible, nous avons dû effectuer l'essai avec les germes âgés de 24 heures dans les mêmes conditions, c'est-à-dire en prélevant la quantité voulue de ces

germes dans le même milieu de culture (macération de viande) :

2^o Comme nous tenons, répétons-le, à avoir un nombre donné de germes dans le milieu d'essai (500 millions par centimètre cube), nous sommes obligée de procéder, avant l'essai, à une numération des germes en émulsion. Nous utilisons pour ceci, comme nous le verrons plus loin, une technique de numération microscopique de tous les germes. Cette technique est assez rapide; elle demande cependant, pour être effectuée, un temps d'une heure environ. Puisque nous étudions ici une question de durée précise (5 heures), il nous est, pour ainsi dire, interdit de dépenser pour la numération des germes une heure supplémentaire, heure pendant laquelle peuvent se produire quelques modifications. En effet, pendant cette heure, il nous est impossible de placer notre culture à une température telle qu'aucune multiplication ne puisse se produire (température de la glacière), car nous risquerions de modifier la vitalité des germes utilisés. Comme nous savons, par ailleurs, notamment d'après des essais effectués dans notre laboratoire même, que la multiplication microbienne en milieu liquide, à partir d'un nombre donné de germes, dans un milieu et à une température donnée, se produit de façon régulière, nous avons tout simplement, par quelques essais préliminaires, déterminé la quantité de germes à ensemercer dans notre macération de viande pour avoir, après 5 heures d'incubation à 37°, le nombre voulu de germes par centimètre cube de cette macération.

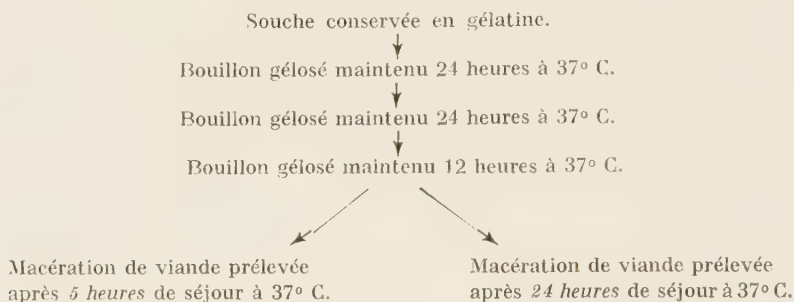
Ceci étant dit, nous pouvons passer à l'exposé de la technique utilisée pour nos essais.

Trois jours avant l'essai, la souche mère conservée en gélatine était journellement repiquée sur bouillon gélosé incliné. Les deux premières cultures faites sur bouillon gélosé étaient laissées à l'étuve pendant 24 heures à 37° C. La troisième culture sur bouillon gélosé n'était laissée que 12 heures à l'étuve à 37° C. Le jour de l'essai, cette culture sur bouillon gélosé, âgée de 12 heures, était émulsionnée en eau distillée avec toutes les précautions habituelles. Cette émulsion servait ensuite à ensemercer la macération de viande de bœuf utilisée, pour la raison ci-dessus donnée, comme milieu de culture liquide. La composition de ce milieu était la suivante :

Viande de bœuf dégraissée hachée	1 000 grammes.
Eau distillée	2 000 —

Cette macération était doncensemencée avec un nombre de centimètres cubes de la suspension microbienne, en eau distillée, suffisants pour que, après 5 heures de culture, la concentration des germes développés dans la macération de viande fût approximativement de 5 milliards par centimètre cube. (Ce nombre de centimètres cubes de suspension aqueuse nécessaire avait, rappelons-le, été déterminé par des essais préliminaires.) La macération de viande ainsiensemencée était alors placée à l'étuve à 37°, où elle était laissée pendant 5 heures, ou pendant 24 heures, selon que l'on voulait effectuer l'essai sur des germes jeunes ou sur des germes plus âgés. Notons que l'ensemencement de ces germes, d'âge différent, était effectué simultanément dans les mêmes conditions,

et que, seul, le temps de séjour à l'étuve de leur milieu de culture était différent. Nous pouvons donc schématiser de la façon suivante la préparation des germes nécessaires aux essais :



Pour effectuer l'essai proprement dit, la quantité de macération de viande à introduire dans le milieu d'essai pour y assurer une concentration en germes de 500 millions par centimètre cube, était, en moyenne, de 3^{cc},5 lorsque cette macération étaitensemencée depuis 5 heures, et de 1^{cc},5 lorsqu'elle étaitensemencée depuis 24 heures. Dans ce dernier cas, c'est-à-dire dans les essais effectués sur des germes âgés de 24 heures, cette quantité de 1^{cc},5 était donc complétée à 3^{cc},5 avec de la macération de viande stérile, afin que les conditions des deux essais fussent exactement semblables.

Le milieu d'essai, ou milieu servant au contact des germes et du désinfectant, était, dans les deux cas, constitué comme suit :

Macération de viande: quantité suffisante pour avoir 500 millions de germes par centimètre cube.

Solution désinfectante: quantités croissantes.

Eau distillée: quantité suffisante pour avoir un volume total de 10 centimètres cubes.

La solution désinfectante n'était ajoutée qu'en dernier lieu dans le mélange, afin d'éviter le contact des germes avec une solution désinfectante trop concentrée.

Pour le reste, les mesures des pouvoirs antibiotiques du bichlorure de mercure, du phénol et de l'iode, vis-à-vis des germes âgés, soit de 5 heures, soit de 24 heures, étaient effectuées de la façon habituelle, telle que nous l'exposerons au troisième chapitre (Technique directe).

Les deux séries d'essais comportèrent chacune un grand nombre de déterminations successives, afin que l'on pût non seulement obtenir des valeurs moyennes, mais encore établir des courbes permettant de tirer des déductions exactes et nettes sur la valeur, et particulièrement sur la régularité, des essais. Nous donnons, ci-dessous, les résultats obtenus, ainsi que les courbes qu'ils nous ont permis d'établir.

Dans chacun des tableaux ci-dessous, on trouvera les diverses doses antibiotiques obtenues dans chacun des essais, la moyenne arithmétique de ces doses, la dose antibiotique obtenue dans le plus grand nombre d'essais et les doses extrêmes obtenues.

Dans chacune des courbes établies d'après ces résultats, on a porté en abscisses les doses antibiotiques en grammes, et en ordonnées le nombre d'essais dans lesquels ces diverses doses ont été retrouvées.

TABLEAU X

Valeurs obtenues comme dose antibiotique du **bichlorure de mercure** vis-à-vis de STAPHYLOCOQUES DORÉS (souche C) âgés de **5 heures** et cultivés en macération de viande à 37° C.

Milieu intermédiaire de l'essai: eau distillée — macération de viande.

Essai n°	Doses antibiotiques (grammes).	Dose antibiotique moyenne (moyenne arithmétique).	Dose antibiotique obtenue dans le plus grand nombre d'essais.	Valeurs extrêmes.
1	de 0,20 à 0,50			
2	de 0,25 à 0,50			
3	0,12			
4	0,28			
5	0,35			
6	0,45			
7	0,45			
8	0,27	0,33	0,45	0,12 et 0,50
9	0,35			
10	0,18			
11	0,22			
12	0,20			
13	0,45			
14	0,15			
15	0,45			
16	0,45			
17	0,45			
18	0,45			

TABLEAU XI

Valeurs obtenues comme dose antibiotique du **bichlorure de mercure** vis-à-vis de STAPHYLOCOQUES DORÉS (souche C) âgés de **24 heures** et cultivés en macération de viande.

Milieu intermédiaire: eau distillée — macération de viande.

Essai n°	Doses antibiotiques (grammes).	Dose antibiotique moyenne (moyenne arithmétique).	Dose antibiotique obtenue dans le plus grand nombre d'essais.	Valeurs extrêmes obtenues.
1.....	0,32			
2.....	0,15			
3.....	0,38			
4.....	0,42			
5.....	0,25	0,31	0,42	0,15 à 0,48
6.....	0,38			
7.....	0,48			
8.....	0,32			
9.....	0,20			
10.....	0,38			
11.....	0,42			
12.....	0,32			
13.....	0,25			
14.....	0,42			
15.....	0,42			
16.....	0,38			
17.....	0,42			
18.....	0,42			

TABLEAU XII

Valeurs obtenues comme dose antibiotique de l'**iode** vis-à-vis de STAPHYLOCOQUES DORÉS (souche C) âgés de **5 heures** et cultivés en macération de viande.

Milieu intermédiaire de l'essai: eau distillée — macération de viande.

Essai n°	Doses antibiotiques (grammes).	Dose antibiotique moyenne (moyenne arithmétique).	Dose antibiotique obtenue dans le plus grand nombre d'essais.	Valeurs extrêmes obtenues.
1.....	de 0,05 à 0,10			
2.....	0,18			
3.....	0,12			
4.....	0,08			
5.....	0,40			
6.....	0,25			
7.....	0,16	0,21	0,25	0,08 à 0,40
8.....	0,25			
9.....	0,12			
10.....	0,25			
11.....	0,40			
12.....	0,18			
13.....	0,15			
14.....	0,25			
15.....	0,25			
16.....	0,25			

TABLEAU XIII

Valeurs obtenues comme dose antibiotique de l'**iode** vis-à-vis de STAPHYLOCOQUES DORÉS (souche C) âgés de **24 heures** et cultivés en macération de viande.

Milieu intermédiaire de l'essai: eau distillée — macération de viande.

Essai n°	Doses antibiotiques (grammes).	Dose antibiotique moyenne (moyenne arithmétique).	Dose antibiotique obtenue dans le plus grand nombre d'essais.	Valeurs extrêmes obtenues.
1.....	0,15			
2.....	0,08			
3.....	0,15			
4.....	0,17			
5.....	0,08	0,11	0,08	0,08 à 0,17
6.....	0,08			
7.....	0,15			
8.....	0,08			
9.....	0,08			
10.....	0,08			
11.....	0,17			
12.....	0,06			
13.....	0,15			
14.....	0,08			
15.....	0,12			
16.....	0,12			
17.....	0,08			

TABLEAU XIV

Valeurs obtenues comme dose antibiotique du **phénol** vis-à-vis de STAPHYLOCOQUES DORÉS (souche C) âgés de **5 heures** et cultivés en macération de viande.

Milieu intermédiaire: eau distillée— macération de viande.

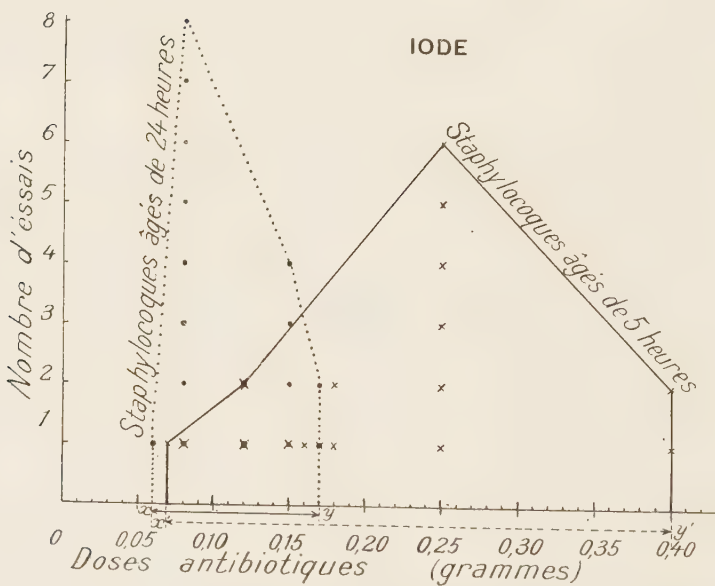
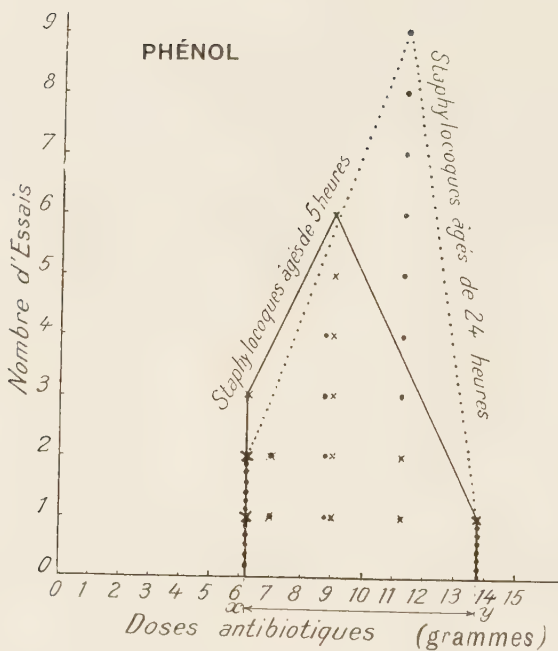
Essai n°	Doses antibiotiques (grammes).	Dose antibiotique moyenne (moyenne arithmétique).	Dose antibiotique obtenue dans le plus grand nombre d'essais.	Valeurs extrêmes obtenues.
1.....	6,25			
2.....	11,25			
3.....	8,75			
4.....	7,0	9,3	9,0	6,25 à 13,75
5.....	9,0			
6.....	7,5			
7.....	9,3			
8.....	11,25			
9.....	7,0			
10.....	13,75			
11.....	9,0			
12.....	6,25			
13.....	9,0			
14.....	6,25			
15.....	9,0			

TABLEAU XV

Valeurs obtenues comme dose antibiotique du **phénol** vis-à-vis de STAPHYLOCOQUES DORÉS (souche C) âgés de **24 heures** et cultivés en macération de viande.

Milieu intermédiaire de l'essai: eau distillée, macération de viande.

Essai n°	Doses antibiotiques (grammes).	Dose antibiotique moyenne (moyenne arithmétique).	Dose antibiotique obtenue dans le plus grand nombre d'essais.	Valeurs extrêmes obtenues
1.....	8,75			
2.....	6,25			
3.....	8,75			
4.....	11,25			
5.....	11,25			
6.....	11,25			
7.....	8,75			
8.....	8,75	10,15	11,25	6,25 à 13,75
9.....	13,75			
10.....	11,25			
11.....	11,25			
12.....	6,25			
13.....	11,25			
14.....	11,25			
15.....	11,25			
16.....	11,25			



Discussion des résultats. — Pour faciliter la comparaison des résultats obtenus dans ces essais, nous donnons le tableau récapitulatif, où sont indiquées, pour les deux sortes de germes, les doses antibiotiques moyennes, les doses extrêmes obtenues et l'écart entre ces doses extrêmes :

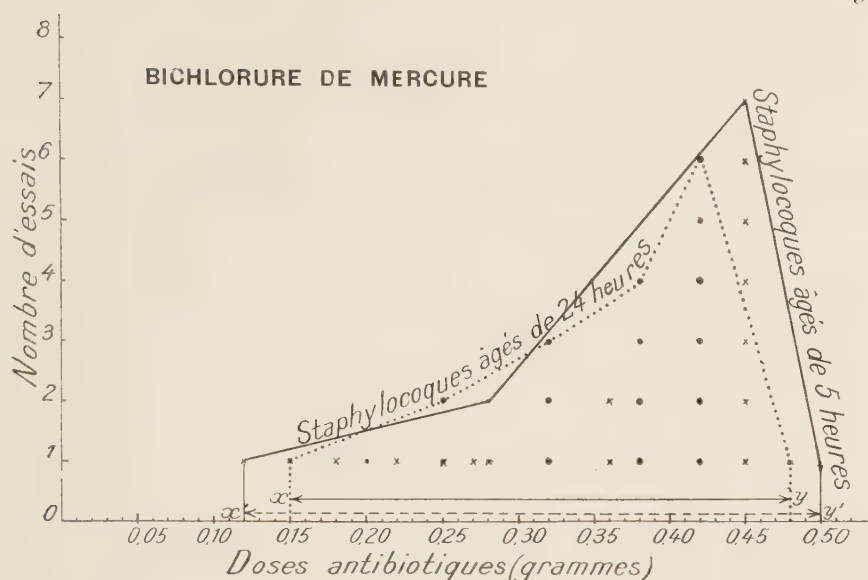


Fig. 4. — Influence de l'âge des germes sur la détermination de la dose antibiotique.
(Milieu d'essai : macération de viande diluée.)

TABLEAU XVI

ESSAIS EN PRÉSENCE DE MACÉRATION DE VIANDE

Désinfectants.	Germes âgés de 5 heures.			Germes âgés de 24 heures.		
	Dose extrême inférieure.	Dose antibiot. moyenne.	Dose extrême supérieure.	Dose extrême inférieure.	Dose antibiot. moyenne.	Dose extrême supérieure.
	(grammes)	(grammes)	(grammes)	(grammes)	(grammes)	(grammes)
Bichlorure de mer- cure.....	0,125 <i>soit 1</i>	0,33 <i>à</i>	0,50 <i>4</i>	0,15 <i>soit 1</i>	0,31 <i>à</i>	0,48 <i>3</i>
Iode	0,08 <i>soit 1</i>	0,21 <i>à</i>	0,40 <i>5</i>	0,08 <i>soit 1</i>	0,11 <i>à</i>	0,17 <i>2</i>
Phénol	6,25 <i>soit 1</i>	9,3 <i>à</i>	13,75 <i>2</i>	6,25 <i>soit 1</i>	10,15 <i>à</i>	13,75 <i>2</i>

1^o La comparaison des *doses moyennes* obtenues avec les germes jeunes et avec les germes âgés de 24 heures nous permet de conclure ce qui suit quant à la résistance de ces germes :

a) La *résistance* au bichlorure de mercure et au phénol est sensiblement

identique pour les deux catégories de germes (les doses antibiotiques sont respectivement 0g,33 et 0g,31 pour le bichlorure de mercure, et 9g,3 et 10g,15 pour le phénol) ;

b) La *résistance* à l'iode est plus grande pour les germes âgés de 5 heures que pour les germes âgés de 24 heures (les doses antibiotiques sont respectivement 0g,21 et 0g,11).

2° La comparaison des *doses extrêmes* obtenues dans les différents essais nous montre que : la *régularité* des résultats est, d'une façon générale, plus grande dans les essais effectués sur des germes âgés de 24 heures que sur des germes âgés de 5 heures. Le rapport des doses extrêmes obtenues est, en effet, le suivant :

Avec les germes âgés de 5 heures.		Avec les germes âgés de 24 heures.	
Pour HgCl ₂	1 à 4		1 à 3
— l'iode	1 à 5		1 à 2
— le phénol	1 à 2		1 à 2

Ceci apparaît, d'ailleurs, nettement si l'on considère l'étalement ou la largeur de base (*x-y*) des courbes données ci-dessus ; l'étalement de la courbe relative aux germes âgés de 5 heures est, dans le cas de l'iode, beaucoup plus grand que celui de la courbe relative aux germes âgés de 24 heures ; il est légèrement plus grand dans le cas du bichlorure de mercure, et les deux étalements sont égaux dans le cas du phénol.

Il ressort des essais que nous venons d'exposer que l'âge de la souche utilisée pour l'essai, toutes autres conditions égales d'ailleurs, n'influence pas d'une façon régulière la résistance des germes aux désinfectants. D'autre part, les résultats obtenus dans ces essais offrent une régularité sensiblement plus marquée lorsque les germes utilisés pour l'essai sont âgés de 24 heures.

Étant donné que la question primordiale ici est bien celle de la régularité des résultats, et que, d'autre part, le prélèvement de germes jeunes impose une technique plus difficile, il nous semble que, contrairement à nos prévisions, nous ayons intérêt à utiliser des souches bactériennes âgées de 24 heures.

En conclusion, après discussion des données bibliographiques et des résultats de nos propres essais, nous avons jugé convenable de fixer comme suit les qualités des germes qui doivent être utilisés pour nos essais :

1° On utilisera les *espèces bactériennes* précédemment citées.

2° Les *souches* de staphylocoques, de colibacilles et, au besoin, celles de bacilles typhiques et paratyphiques, seront conservées en bouillon gélatiné, dans un endroit frais. Chaque mois, un de ces tubes de bouillon gélatiné ensemencé sera placé à 37° pendant 24 heures, ce qui permettra une reprise de la culture et une liquéfaction du milieu, et un repiquage dans un autre tube de gélatine liquide sera effectué. Après un séjour de 24 heures à l'étuve à 37°, ce nouveau tube sera conservé au frais. À partir du troisième jour précédant l'essai, la souche sera repiquée journellement sur gélose et placée à 37°.

Les souches de *Bacillus subtilis* seront conservées dans un endroit frais, sur bouillon gélosé incliné, et les cultures destinées à l'essai seront ensemencées sur plaques de gélose en boîtes de Pétri, 5 jours avant l'essai, et placées à l'étuve à 37° afin d'assurer la sporulation.

Les souches de bacilles diphtériques seront conservées et repiquées tous les mois en bouillon additionné de liquide d'ascite. Les cultures utilisées pour l'essai seront faites sur bouillon gélosé incliné, additionné de liquide d'ascite.

Il va sans dire qu'une souche déterminée sera utilisée pour chacun de ces organismes. La résistance de ces souches sera vérifiée tous les mois par un essai à l'iode effectué selon la technique directe de mesure antibiotique.

3° L'organisme sporulé mis à part, les cultures utilisées pour l'essai seront âgées de 24 heures et cultivées à 37° C.

4° Les divers milieux utilisés, et en particulier du bouillon de culture, seront de composition et de réaction rigoureusement constantes, tels que nous les avons définis dans notre troisième chapitre.

C. — Influence exercée sur l'essai d'un désinfectant par la nature du milieu dans lequel les germes sont mis en suspension avant l'essai.

Après avoir examiné le rôle important joué, dans la mesure du pouvoir antiseptique, par la quantité des germes mis en expérience, et par leur qualité, c'est-à-dire leur degré de résistance aux actions antiseptiques, il nous faut donner quelques détails sur le *mode d'exposition des germes à l'action antiseptique*. Nous avons déjà vu, au cours du premier chapitre, qu'il était, de beaucoup, préférable de faire agir les substances antiseptiques sur des émulsions microbiennes homogènes que sur des amas microbiens desséchés sur porte-germes. Voyons maintenant dans quel liquide il convient de préparer ces émulsions.

On conçoit facilement que ce point puisse présenter quelque importance, puisque c'est ce liquide de suspension qui, ajouté au solvant de la substance antiseptique, constitue finalement, tout au moins en partie, le milieu où s'effectue l'action antiseptique.

Nous avons vu, en étudiant les méthodes de mesure du « coefficient phénol », que les germes y étaient utilisés sous forme de culture en bouillon, directement prélevée. Nous pensons que ce procédé est défectueux. Nous verrons plus loin, en effet, à quel point la présence de matières albuminoïdes ou salines peut modifier l'essai de la valeur antiseptique des substances chimiques. Certes, il convient, dans certains cas, pour se rapprocher des conditions de la pratique, d'effectuer les mesures en présence de sels ou d'albumine. Mais, dans ces cas, il faut agir en présence de quantités bien déterminées d'albumine ou de sels parfaitement définis. Apporter dans le milieu, en même temps que les germes, des quantités indéterminées de substances étrangères mal définies, c'est s'interdire la

reproduction exacte de l'expérience, et, par conséquent, obtenir des résultats sans valeur réelle.

Quel milieu de suspension faut-il donc choisir pour que la vitalité des germes soit conservée depuis le prélèvement de ces germes sur le bouillon gélosé jusqu'à leur mise en contact avec l'antiseptique ?

Les cellules bactériennes sont, comme les autres cellules végétales, ou animales, soumises, tout au moins en partie, aux lois de l'osmose. Il faut donc logiquement s'adresser, pour émulsionner les germes, à des solutions salines présentant une certaine pression osmotique. La plupart des auteurs se sont adressés, tout naturellement, à la solution de chlorure de sodium à 8,5 p. 1 000, dite « solution physiologique ». Cette coutume, si répandue en bactériologie, est-elle à conseiller dans le cas présent ? Nous ne le pensons pas.

Dans ces dernières années, en effet, certains auteurs ont montré que le chlorure de sodium, même à un taux relativement faible, tel que celui que nous venons d'indiquer, nuit à la vitalité de la cellule microbienne.

Déjà Miquel ⁽¹⁹⁶⁾, en 1902, avait montré que le chlorure de sodium seul possédait un pouvoir « infertilisant » net.

Depuis, d'autres auteurs, tels que Ficker ⁽⁹⁸⁾ (1899), d'Hérelle ⁽¹³⁴⁾ (1921), Wilson et Scherrer ⁽³⁰⁷⁾, Legroux et Eliava ⁽¹⁷⁵⁾ en 1921, Duthoit ⁽⁸⁴⁾ (1923), H. Schmidt ⁽²⁶⁵⁾ (1924), Panisset, Verge et Carneiro ⁽²¹⁵⁾ en 1925, Ballantyne ⁽⁷⁾ (1930), etc..., ont montré que l'eau salée exerçait sur les microbes une influence nuisible.

Pour certains de ces auteurs même, cette influence est extrêmement rapide et se ferait sentir dès les premières heures de contact. Duthoit, par exemple, considère que les suspensions microbiennes en « sérum physiologique » sont virtuellement stérilisées en 10 heures et demie, et que la grande majorité des germes est même tuée entre la première demi-heure et la quatrième heure.

Ces résultats ne sauraient, d'ailleurs, nous étonner. Depuis les travaux de Loeb, nous savons, en effet, que les sels alcalins, isolés par suite d'une perméabilité plus grande, lèsent très facilement les cellules vivantes.

Nous savons aussi que cette action toxique indéniable peut être neutralisée en partie par addition aux sels alcalins de petites quantités de sels alcalino-terreux. Quoi qu'il en soit, nous devons éviter d'utiliser comme milieu de suspension la solution salée physiologique, tant que nous n'y serons pas obligés par quelque raison particulière. Il semblerait plus propice, si nous nous en rapportons aux observations de Loeb, confirmées depuis par de nombreux auteurs, d'utiliser, pour préparer les émulsions microbiennes, des *solutions équilibrées*, où l'action nuisible des sels alcalins serait contrebalancée au maximum par la présence d'autres sels bi- ou plurivalents.

Mais notre but, dans le cas présent, n'est pas seulement de maintenir la vitalité des micro-organismes. Il nous faut encore éviter de modifier l'action de la substance antiseptique. Or, le chlorure de sodium, seul, modifie déjà, comme nous le verrons plus loin, de façon très apparente, l'action antiseptique du phénol et du sublimé, par des modifications d'ionisation vraisemblablement. Par addition au milieu d'autres sels, tels que chlorure de calcium, phosphate ou bicarbonate de soude, sels de magnésium, etc..., nous modifions, de façon plus complexe encore,

les actions antiseptiques que nous cherchons à mesurer, sans nous rendre compte exactement des phénomènes ainsi produits.

Tout ceci nous amène, autant pour conserver la vitalité des souches que pour éviter de modifier l'action antiseptique, à renoncer à l'emploi, comme milieux de suspension, de solutions salines simples ou équilibrées.

Voyons maintenant si l'eau distillée peut être utilisée dans ce but :

Certes, l'eau distillée n'est pas dépourvue de toute nocivité pour les organismes microbiens. La plupart des auteurs cités plus haut ont également montré que l'eau distillée pouvait être nuisible aux bactéries, et, parmi eux, Ficker, Legroux et Eliava, particulièrement. Cependant, d'autres bactériologistes tels que Panisset, Verge et Carneiro, Ballantyne, ont montré que l'eau distillée était nettement moins nuisible que la solution salée physiologique. Ceci ne saurait nous étonner si nous considérons la facilité remarquable avec laquelle les bactéries s'adaptent à des variations osmotiques fort diverses. Certains auteurs, tels que Legroux, ont conseillé d'ajouter à l'eau distillée de petites quantités de substances organiques, peptones, etc., qui se montreraient capables de protéger les germes contre l'action nuisible du liquide. Malheureusement, ces substances organiques, en si petite quantité soient-elles, viendraient modifier l'action antiseptique. Nous sommes donc dans l'obligation de nous adresser, pour préparer nos émulsions bactériennes, à l'eau distillée pure. Nous pensons pouvoir admettre que l'eau distillée, dans l'espace de temps relativement court pendant lequel les bactéries seront maintenues en suspension, ne modifiera pas de façon apparente leur vitalité. En tous cas, en utilisant l'eau distillée, nous sommes certains de ne pas apporter de matières organiques ou de sels minéraux capables de modifier l'action antiseptique, action que nous cherchons, avant tout, à obtenir aussi pure que possible.

Nous avons donc utilisé, pour préparer nos émulsions microbiennes, de l'eau bidistillée préparée par deux distillations successives, la première en présence d'une petite quantité d'acide phosphorique, la deuxième en présence d'une petite quantité de baryte. Cette eau doit présenter un pH voisin de 6 à 6,2. Il est bien évident que l'émulsion microbienne est toujours préparée au dernier moment, immédiatement avant l'essai, afin que le séjour des germes dans l'eau soit aussi court que possible. Aussitôt l'émulsion préparée, nous avons coutume de la placer dans la glace fondante, afin d'éviter une multiplication ultérieure des bactéries pendant que l'on procède à leur numération (1).

La technique de préparation des émulsions microbiennes est la suivante : on utilise des fioles d'Erlenmeyer en verre Pyrex, contenant la quantité d'eau bidistillée voulue, exactement mesurée, et quelques billes de verre. Le tout est stérilisé pendant 20 minutes à 120°. Dans cette eau, on émulsionne les germes prélevés sur des cultures sur gélose âgées de 24 heures, entretenus de la façon décrite plus haut. On prend soin d'effectuer le prélèvement avec une anse de platine suffisamment

(1) Nous avons tout dernièrement trouvé une référence de Ballantyne qui pense que la vitalité des émulsions bactériennes est mieux conservée à la température ambiante qu'à la température de la glace fondante. Peut-être conviendrait-il, dans ce cas, de modifier ce point particulier de notre technique.

refroidie, et on fait en sorte de ne pas entraîner de gélose. Les germes ainsi prélevés sont alors émulsionnés progressivement : tout d'abord on les étale sur les parois de la fiole d'Erlenmeyer, dans une petite goutte d'eau, puis on les entraîne peu à peu dans l'eau distillée, où une vigoureuse agitation circulaire achève, grâce à la présence des billes de verre, de donner une répartition uniforme. Il convient de vérifier qu'aucun amas n'existe dans cette émulsion ; sinon, il faudrait recommencer l'agitation du récipient, ou procéder à une filtration sur coton ou même sur filtre de papier peu épais. Remarquons, pour terminer, qu'il convient d'agiter vigoureusement cette émulsion pendant plusieurs minutes, lorsqu'on effectue les prélèvements nécessaires à la numération, puis à la préparation de l'émulsion finale titrée, et qu'il faut, évidemment, n'utiliser pour ces prélèvements que des pipettes stériles absolument sèches.

III. — FACTEURS LIÉS A LA NATURE DU MILIEU INTERMÉDIAIRE

Après avoir examiné l'influence exercée sur le processus de désinfection par ses deux principaux termes : l'organisme microbien, et la substance antiseptique, il nous faut étudier le rôle que joue, dans les phénomènes résultant de leur contact, le milieu qui leur sert d'intermédiaire. Nous avons vu que ce milieu intermédiaire est constitué par l'eau distillée qui sert à la dissolution de la substance antiseptique et par l'eau distillée qui sert à la mise en suspension des germes. Il nous reste à examiner les modifications que l'on peut faire subir à ce milieu intermédiaire, en ajoutant à l'eau distillée qui lui sert de base telle ou telle substance, et à voir quelles influences exerceront ces modifications sur les résultats donnés par la mesure du pouvoir antibiotique.

De même que certaines réactions chimiques, l'action désinfectante peut être accélérée ou renforcée, ralentie ou atténuée, selon les qualités physiques ou chimiques du milieu dans lequel s'effectue cette action. Comme nous l'avons déjà noté au sujet de l'influence exercée sur l'action désinfectante par la nature de la solution désinfectante, il serait très intéressant d'étudier à fond l'influence des variations des qualités physiques ou physico-chimiques (pH , tension superficielle, etc...) du milieu intermédiaire. Mais ces considérations, d'un domaine exclusivement théorique, ne nous sont pas permises ici. Nous nous contenterons donc, connaissant toute l'importance de ces facteurs physiques, et particulièrement du pH , de les fixer une fois pour toutes. Nous n'étudierons donc spécialement que des facteurs dont l'action intervient de toute évidence dans la nature. Ces facteurs, plus spécialement chimiques, seront, en particulier, la présence de matières salines et celle de matières albumineuses. Rappelons-nous, en effet, qu'il est extrêmement rare que l'action désinfectante ait à s'exercer sur des germes en simple suspension dans l'eau distillée. L'action désinfectante s'adresse à des eaux contenant en dissolution des matières salines, ou à des liquides d'excrétion

ou de sécrétion, chargés de sels et d'albumine. Il nous faut donc examiner à quel degré ces substances sont susceptibles de modifier l'action désinfectante et dans quel sens. Comme nous l'avons fait jusqu'ici, nous commencerons par passer brièvement en revue les diverses observations faites à ce sujet, puis nous apporterons les données que nous avons pu recueillir nous-mêmes.

A. — Influence des matières salines, et plus particulièrement du chlorure de sodium, sur l'action désinfectante.

On a, depuis longtemps, constaté que les substances salines influençaient l'action désinfectante de certaines substances chimiques. Aussi, les travaux effectués à ce sujet sont-ils fort nombreux, aussi bien en ce qui concerne l'influence qu'exercent les sels alcalino-terreux que celle qu'exercent les sels alcalins. Nous nous bornerons à mentionner ici l'action du plus important de ces sels, de celui que l'on trouve dans toutes les sécrétions animales, et presque toujours dans la nature : le chlorure de sodium. Nous prendrons donc ce sel comme type des matières salines et nous étudierons son influence sur les pouvoirs désinfectants de deux antiseptiques fort différents : le phénol et le sublimé.

1^o INFLUENCE DU CHLORURE DE SODIUM
SUR LE POUVOIR ANTISEPTIQUE DU PHÉNOL

Dès 1895, Scheurlen ⁽²⁶³⁾ trouva que l'addition de chlorure de sodium à une solution de phénol augmentait la toxicité de ce dernier corps pour le bacille du charbon. Ceci fut confirmé, en 1895, par Beckmann ⁽¹⁴⁾, qui chercha à expliquer ce phénomène par l'hypothèse que le chlorure de sodium modifiait la solubilité dans l'eau du phénol. Paul et Krönig (1897) retrouvèrent à leur tour ce fait. Weyland et Römer ⁽³⁰⁵⁾ admirent, de leur côté, que le chlorure de sodium agissait en attaquant les parois des micro-organismes et en les rendant perméables au phénol ; ce corps pouvait alors agir en précipitant les albumines cellulaires. Spiro et Burns ⁽²⁸¹⁾ ne purent confirmer ces hypothèses. Ils étudièrent comparativement l'action exercée par le chlorure de sodium et divers autres sels sur le phénol et constatèrent que ces diverses substances modifiaient la force désinfectante du phénol, proportionnellement à la faculté qu'ils possèdent de précipiter ce corps. Ils furent ainsi amenés à admettre que les sels augmentaient l'action désinfectante du phénol en chassant ce corps de ses solutions aqueuses, et en augmentant, de ce fait, sa fixation par la cellule bactérienne.

En 1923, Reichel ⁽²⁴²⁾ reprit cette question et étudia systématiquement l'influence qu'exerce le chlorure de sodium sur le partage du phénol entre l'eau et les principaux constituants de la cellule bactérienne, les

lipoides et les albumines. Dans une première série d'expériences, il étudia le partage du phénol entre les substances lipoidiques et l'eau. Il nota que l'addition du chlorure de sodium au système eau-huile-phénol amenait un déplacement croissant du phénol au profit de la phase huileuse. Dans une deuxième série d'expériences, il étudia le même phénomène en remplaçant les substances lipoidiques par des substances albumineuses. Il constata que le chlorure de sodium influençait, comme précédemment, le partage du phénol entre l'eau et l'albumine. Il effectua ensuite des essais complémentaires afin de voir si la fixation du phénol par l'albumine était due à un phénomène d'adsorption ou à un processus simple de solution. Enfin, mettant en jeu les cellules bactériennes elles-mêmes, il retrouva que les corps bactériens fixaient une plus grande quantité de phénol en présence de chlorure de sodium qu'en son absence.

Depuis, d'autres auteurs reprirent cette étude et cherchèrent notamment à savoir si cette augmentation de toxicité du phénol en présence de chlorure de sodium correspondait bien à une plus grande fixation du phénol, ou si elle était due à une augmentation du pouvoir toxique, pour une même quantité de phénol fixé. Sans entrer ici dans le détail d'expériences dont la portée est surtout théorique, nous devons citer les essais de Lemon ⁽¹⁷⁶⁾ (1920) et ceux de L.-W. Miller ⁽¹⁹⁴⁾. Le premier de ces auteurs conclut de ses essais que deux solutions de phénol avec ou sans sel sont également toxiques si leur composition est telle qu'elles soient en équilibre avec une solution donnée de phénol dans le toluène. Le second, ayant réalisé les mêmes conditions, constata, au contraire, que les solutions salines continuaient à se montrer plus toxiques.

Quoi qu'il en soit, si nous considérons l'ensemble de ces travaux, nous voyons que la plupart des auteurs sont d'accord pour admettre que la présence du chlorure de sodium augmente le pouvoir antiseptique du phénol. Nous verrons, dans le troisième chapitre, ce que nos essais nous permettent de penser à ce sujet.

2^o INFLUENCE DU CHLORURE DE SODIUM SUR LE POUVOIR ANTISEPTIQUE DU BICHLORURE DE MERCURE

Paul et Krönig, en 1897, étudièrent l'influence exercée par le chlorure de sodium sur l'activité de solutions aqueuses de différents sels de mercure. Ils constatèrent que l'addition de chlorure de sodium aux solutions aqueuses de bichlorure de mercure diminuait l'activité de cet antiseptique. Ils attribuèrent cette action, d'une part à la diminution de la dissociation du bichlorure de mercure, et, d'autre part, à la formation d'un complexe, Cl^3HgNa , insoluble dans les lipoides. Cette étude fut reprise depuis, par d'autres auteurs, et l'interprétation de Paul et Krönig fut critiquée. On remarqua, notamment, que des sels plus dissociés que le sublimé en solutions aqueuses, tels que le nitrate de mercure, étaient cependant moins actifs. Höber ⁽¹⁴⁴⁾ insista donc sur le rôle important joué par la liposolubilité du sublimé. Une autre interprétation du phé-

nomène fut proposée par Krahé ⁽¹⁶³⁾ en 1926. Ayant étudié l'adsorption du bichlorure de mercure par le charbon, avec addition variable de chlorure de sodium à la solution antiseptique, il trouva que l'augmentation de la concentration en chlorure de sodium entraînait une diminution de la quantité de bichlorure de mercure adsorbée.

Nous n'insisterons pas davantage sur ce problème, très intéressant du point de vue théorique, nous noterons seulement que l'activité désinfectante du bichlorure de mercure est, d'après tous les auteurs, contrairement à celle du phénol, atténuée par la présence de chlorure de sodium.

B. — Influence de l'albumine, ou d'autres substances organiques, sur l'action désinfectante.

L'influence inhibitrice qu'exercent les matières organiques sur l'activité des substances désinfectantes est connue depuis fort longtemps. C'est ainsi que de nombreux travaux ont été effectués pour étudier l'influence de corps tels que la lécithine [Schieman et Ishiwara ⁽²⁶⁴⁾ (1914), Cooper et Woodhouse ⁽⁵⁸⁾ (1923), Hirschfelder et Decherd ⁽¹⁴²⁾ (1918), etc...], la cholestérine (Hieschfelder et Decherd), le coton et la laine (Lockemann, Geng et Pilcher ⁽¹⁸⁴⁾ (1928), les poussières (Miss Chick) (1908), etc... Mais la plupart des travaux concernent plus spécialement l'influence inhibitrice de l'albumine. Ainsi, Koch (1881) montra que le bacille du charbon résistait beaucoup moins aux actions nocives dans l'eau que dans des solutions nutritives telles que le bouillon peptoné. Settler ⁽²⁸¹⁾ (1884) nota que les substances antiseptiques présentaient une activité antigénétique variable selon le milieu où elles avaient à exercer leur action. Il montra l'importance, à ce sujet, des substances albumineuses, substances susceptibles de contracter, avec certains antiseptiques, des combinaisons insolubles, et de leur faire perdre ainsi toute activité antiseptique. Il utilisait, pour ses essais, du bouillon de veau additionné de sang et de muscle. Ce point fut repris par V. Behring ⁽¹⁷⁾ (1887-1890) qui montra qu'une solution de bichlorure de mercure était beaucoup plus active sur le bacille du charbon maintenu dans l'eau, que sur ce même germe placé dans un milieu intermédiaire additionné de sérum sanguin.

Depuis, comme nous l'avons vu ci-dessus, le pouvoir inhibiteur de diverses albumines fut systématiquement étudié pour la mise au point des méthodes d'essai des substances antiseptiques [Kenwood et Hewlett ⁽¹³⁹⁾ (1906), Somerville et Walker ⁽²⁸⁰⁾ (1906), Wynter Blyth ⁽²⁸⁾ (1908), Miss Chick (1908), Nicolle et Jouan ⁽²⁰⁴⁾ (1918), Martin Hahn ⁽¹²⁵⁾ (1922), etc...] Cette question reprit une grande importance pendant la guerre, où les bactériologistes, cherchant à se rapprocher des conditions pratiques du traitement des plaies, étudièrent l'influence, sur l'activité antiseptique, des albumines provenant des sérosités, du sang, du pus, etc... [Delbet ⁽⁷²⁾ et Fiessinger, Dakin et Dunham ⁽⁶⁶⁾, Emery ⁽⁹²⁾, etc...] Ces auteurs constatèrent que la plupart des désinfectants étudiés présentaient une diminution nette d'activité en présence des

albumines. Ceci amena même certains de ces auteurs à rechercher des antiseptiques capables d'agir sans perte d'activité en milieux albumineux.

Tout ceci nous montre à quel point la constitution du milieu intermédiaire doit intervenir dans les résultats trouvés pour la mesure de l'action désinfectante.

Pour nos essais personnels, désirant nous rapprocher le plus possible des conditions de la pratique, il nous a semblé nécessaire d'essayer le pouvoir antibiotique des substances chimiques en prenant comme milieu intermédiaire non seulement l'eau distillée, mais aussi de l'eau distillée contenant des quantités connues de chlorure de sodium et d'albumine.

Les résultats ainsi obtenus seront donnés plus loin, dans le troisième chapitre. Disons seulement, ici, que nous n'avons pas retrouvé pour le phénol l'action renforçante qu'exercerait sur son activité antiseptique la présence du chlorure de sodium. Par contre, nous sommes en parfait accord avec les auteurs précédents en ce qui concerne l'action du chlorure de sodium sur l'activité du bichlorure de mercure, et l'action de l'albumine sur la plupart des substances antiseptiques.

IV. — FACTEURS DÉPENDANT DES CONDITIONS EXTÉRIEURES A L'ESSAI

A. — Influence de la température sur les résultats de l'essai d'un désinfectant.

On sait qu'il existe, pour la multiplication des différentes espèces bactériennes, des températures maxima et minima, en dehors desquelles la multiplication des germes ne se produit plus. On sait également que ces températures varient selon les espèces microbiennes considérées. Par ailleurs, on connaît l'action désinfectante exercée sur les germes par des températures suffisamment élevées. Si, donc, l'on se propose d'examiner l'influence exercée par la température ambiante sur le phénomène de la désinfection, par les agents chimiques antiseptiques, il est bien entendu qu'il ne s'agit que de températures compatibles avec la poussée des germes et incapables de produire par elles-mêmes un arrêt de la multiplication microbienne.

Que l'on considère le phénomène de désinfection comme une réaction chimique ou comme un phénomène physique, ou physico-chimique, l'on doit s'attendre à voir la température influencer largement son cours.

Plusieurs auteurs ont montré que, dans les limites compatibles avec la vie des germes, la vitesse de la désinfection croît régulièrement avec l'augmentation de la température. [Koch (1881), Saint-Hilaire (1888), Chauveau et Arloing ⁽⁴⁶⁾ (1884), Heule ⁽¹³⁶⁾ (1889), V. Behring ⁽¹⁶⁾ (1890), Hammer ⁽¹³⁰⁾ (1891), Heider ⁽¹³²⁾ (1892).] De même Richet ⁽²⁵⁰⁾

(1895) nota que l'addition de 0g,05 de bichlorure de mercure à 1 000 grammes d'urine empêchait la putréfaction à 43° C., et n'agissait pas à 15° C. D'après Heider (1892), une solution de phénol à 5 p. 100 tuait les spores du bacille du charbon en 30 à 40 jours à la température ambiante, en 4 heures à 40° C., en 1 à 2 heures à 55° C., et en 3 à 15 minutes à 75° C. Mais il est permis de se demander si, dans les exemples cités par Heider, l'action bactéricide propre de la chaleur n'intervient pas également.

L'influence de la température sur l'action des désinfectants fut spécialement étudiée par Madsen et Nyman ⁽¹⁸⁸⁾ (1907), par Miss Chick ⁽⁴⁸⁾ (1908), et par Paul ⁽²¹⁶⁾ (1909). Ces auteurs étudièrent les variations du processus de désinfection ainsi produites, afin d'en tirer des conclusions sur la nature de ce processus et de voir s'il était assimilable à une réaction chimique monomoléculaire. Madsen et Nyman montrèrent que la vitesse de désinfection des spores de bacille du charbon, par le bichlorure de mercure, était accrue de deux à trois fois pour une augmentation de 10° C. entre les températures de 25° et 35° C. Paul constata que la destruction par des substances acides de bactéries desséchées sur grenats se faisait 1,7 fois plus rapidement à la température ambiante (16° à 18°) qu'à 6° à 8° C. Miss Chick, étudiant les lois qui régissent le processus de désinfection, établit que ce processus était régulièrement influencé par la température selon la formule d'Arrhénius :

$$A = \frac{T^0 - T^n}{t^0 - t^n} \log. \frac{K^0}{K^n},$$

dans laquelle A est une constante, K⁰ et Kⁿ sont des constantes de vitesse de la réaction en question, correspondant respectivement aux températures : T⁰ et Tⁿ.

Cette équation avait, du reste, déjà été appliquée, par Madsen et Nyman, à la désinfection des spores du bacille du charbon par le bichlorure de mercure. Miss Chick a montré qu'elle s'appliquait également à la désinfection du bacille paratyphique par le bichlorure de mercure et par l'azotate d'argent. Dans le cas de la désinfection de ce bacille par les sels métalliques, Miss Chick a constaté que la vitesse de réaction était augmentée d'environ trois fois par une augmentation de température de 10° C., mais que, pour le phénol, le coefficient de température était beaucoup plus élevé : il atteignait 7 à 8 au lieu de 3, pour une augmentation de température de 10° C. Ayant, par ailleurs, constaté que le coefficient de température était augmenté lorsque le nombre des germes désinfectés était plus grand, Miss Chick, après expérimentation, expliqua ce fait en faisant intervenir les différences de résistance entre les différents individus : les individus les plus jeunes et les plus résistants présentaient un coefficient de température plus élevé que les formes plus âgées, moins résistantes. Ce coefficient variait de 10 à 2 selon l'âge et le nombre des bactéries traitées. Le coefficient de température du processus de désinfection varie donc avec le désinfectant, avec le nombre et l'âge des bactéries.

Ce coefficient de température varie également, comme l'ont montré Paul, Birstein et Reuss ⁽²¹⁸⁾ (1910), avec l'échelle des températures

considérées ; ainsi, pour une élévation de température de 10° C., l'augmentation de la vitesse de désinfection est plus petite entre 24°,9 et 37°,4 qu'entre 18° et 37°,4.

En 1911, Phelps ⁽²²⁴⁾, cherchant à établir une détermination mathématique du processus de désinfection, analysa les variations de l'activité d'un désinfectant par rapport à sa concentration, à son temps d'action, et à la température à laquelle il agissait. Il indiqua comment il était possible de fixer ces constantes.

En 1914, Seiffert ⁽²⁷⁵⁾ nota que la destruction des germes pathogènes par la glycérine était plus accentuée aux températures élevées (22° et 37°) qu'aux basses températures (10 et 6°). Il constata même que le pouvoir antiseptique disparaissait à 0°.

A. E. Cooper et R. B. Haines ⁽⁵⁶⁾ (1928) classèrent les désinfectants en trois groupes principaux, selon l'influence exercée sur leur action par la température. Ils distinguèrent ainsi :

1° Les substances dont l'activité n'est pas modifiée par une augmentation de température. Parmi ces substances, on trouve particulièrement les substances chimiques, douées d'un pouvoir réducteur ;

2° Celles qui présentent une activité deux fois plus grande par accroissement de température de 20° à 37° : le phénol et les alcalis ;

3° Celles dont l'activité est accrue de dix à vingt fois pour la même augmentation de température : les agents oxydants.

Les auteurs notèrent également que l'effet de la température sur l'activité germicide différait selon le germe considéré. Dans un même ordre d'idées, Winslow ⁽³⁰⁸⁾ (1918) nota que le coefficient de température se montrait beaucoup plus faible pour le colibacille que pour le bacille typhique.

ESSAIS PERSONNELS

Étant donné que les résultats trouvés par ces différents auteurs ne sont pas absolument concordants et que quelques auteurs même ont contesté l'existence d'une influence régulière de la température sur l'action antiseptique [Eijkmann ⁽⁸⁹⁾, Croner ⁽⁶¹⁾], nous avons cru devoir effectuer un certain nombre d'essais pour voir si des variations de température pouvaient modifier le résultat de l'essai antibiotique. Nous avons donc, utilisant notre technique habituelle décrite au chapitre suivant, effectué une série d'essais semblables, en faisant varier un seul facteur : la température de l'essai. Nous avons ainsi déterminé les doses antibiotiques du phénol, du bichlorure de mercure et de l'iode, vis-à-vis du staphylocoque, aux températures de 4° C. (température de la glace fondante), de 20° C. (température de l'essai normal) et de 37° C. (température d'incubation des cultures et des subcultures). Les doses antibiotiques obtenues pour ces diverses températures sont indiquées dans le tableau suivant :

TABLEAU XVII

INFLUENCE, SUR L'ESSAI ANTIBIOTIQUE, DE LA TEMPÉRATURE
DE L'ESSAI.

Germes: Staphylocoques en suspension dans l'eau distillée, à raison de 500 millions par centimètre cube. Temps de contact de l'antiseptique et des germes: 15 minutes.

Désinfectants.	Doses antibiotiques (grammes).		
	Température de l'essai.		
	4°.	20°.	37°.
Phénol.....	15,7	11	10,27
HgCl ²	0,26	0,11	0,11
Iode.....	0,017	0,013	

[Pour l'iode (en solution dans l'iodure de potassium), l'essai à 37° ne peut pas avoir de valeur, car, à cette température, la perte d'iode est déjà nette.]

Les valeurs trouvées nous montrent nettement que la détermination du pouvoir antibiotique d'une substance est influencée par la température de l'essai, et que, pour les substances essayées, les doses antibiotiques deviennent de plus en plus faibles lorsque la température de l'essai passe de 4° à 37°. Nous pouvons donc conclure, en accord avec les auteurs précédemment cités, que le pouvoir bactéricide augmente à mesure que croît la température de l'essai.

Nous voyons, d'autre part, que l'influence de la température ne se fait pas sentir à un même degré pour les différents désinfectants étudiés. Ainsi, quand on passe de 4° à 37°, les doses antibiotiques diminuent : pour le sublimé, de 0g,26 à 0g,11, soit de 57 p. 100, et, pour le phénol, de 15g,7 à 10g,2, soit de 33 p. 100.

De ces faits se dégage, au point de vue pratique, la nécessité absolue d'effectuer les essais à une température constante.

Quelle doit être cette température ? Il n'y a aucune raison pour choisir une température autre que celle qui se trouve en moyenne réalisée dans la nature dans nos régions. C'est pourquoi nous avons adopté, comme l'avaient déjà fait de nombreux auteurs, la température de 18° à 20° C. Lorsque la température du laboratoire s'écarte de ces limites, les tubes en expérience sont placés dans un bain-marie réglé à cette température.

B. — Influence du temps de contact entre l'antiseptique et les germes sur les résultats de l'essai.

Il est presque évident, *a priori*, que l'activité d'une substance désinfectante est fonction de sa durée d'action. En effet, dans tout phénomène graduel où deux termes sont en contact, la durée de ce contact entre en jeu pour le résultat final du phénomène. Or, comme nous l'avons vu, le processus de désinfection est avant tout un phénomène graduel et de nombreux auteurs l'ont étudié en suivant son évolution dans le temps.

Le fait que l'action d'un désinfectant dépend de la durée de cette action a, d'ailleurs, été constaté par tous les premiers auteurs qui se sont occupés de la question. R. Koch, dès 1881, montra que, pour tuer en 2 jours les spores du bacille du charbon, il fallait faire agir une solution d'acide phénique à 5 p. 100, alors qu'il fallait une solution à 4 p. 100 seulement pour les tuer en 3 jours, et une solution à 1 p. 100 pour les tuer en 7 jours. Des résultats semblables furent obtenus par Paul et Krönig ⁽¹⁶⁴⁾ et aussi par Miss Chick et Martin ⁽⁵⁰⁾ (1908), dans leurs études sur les lois de la désinfection. Miss Chick ⁽⁴⁸⁾, dans des essais de désinfection du bacille paratyphique, trouva que la stérilisation par le phénol était obtenue en 2 minutes et demie avec une solution à 12 p. 100, alors qu'il suffisait d'une solution à 10,4 p. 100 pour tuer les germes en 10 minutes. Avec le bichlorure de mercure, il fallait une solution à 0,88 p. 1 000 pour tuer les germes en 2 minutes et demie, et une solution à 0,06 p. 1000 pour les tuer en 10 minutes. Avec le nitrate d'argent, il fallait une solution à 0,068 p. 1000 pour tuer les germes en deux minutes et demie et une solution à 0,015 p. 1000 pour les tuer en 10 minutes.

ESSAIS PERSONNELS

Pour notre part, utilisant notre technique habituelle (méthode directe), que nous exposerons dans le troisième chapitre, nous avons effectué des essais en vue de déterminer dans quelle mesure la dose antibiotique dépend du temps laissé au désinfectant pour exercer son action sur les germes.

Toutes les autres conditions de l'essai étant maintenues fixes, nous n'avons fait varier que le temps de contact entre l'antiseptique et les germes. Nous avons choisi pour ces essais les temps de contact de : 5 minutes, 15 minutes (temps habituel de l'essai), 30 minutes, 60 minutes et 24 heures.

La détermination des valeurs antibiotiques, avec ces différents temps de contact, a été effectuée sur les trois substances chimiques, représentant chacune un groupe différent de désinfectants, que nous avons jusqu'à présent étudiées :

Le phénol (en solution aqueuse à 5 p. 100) ;

Le bichlorure de mercure (en solution aqueuse à 1 p. 1 000) ;

L'iode (en solution aqueuse iodurée, à 1 p. 100).

Les résultats obtenus dans ces essais sont groupés dans le tableau suivant. Ils représentent tous la moyenne de plusieurs essais.

TABLEAU XVIII

INFLUENCE SUR L'ESSAI ANTIBIOTIQUE DE LA DURÉE DE CONTACT DE L'ANTISEPTIQUE ET DES GERMES

Germe: Staphylococcus aureus en suspension dans l'eau distillée à raison de 500 millions par centimètre cube. Température de l'essai: 20° C.

Désinfectants :	Doses antibiotiques (grammes).				
	Temps de contact.				
	5 minutes.	15 minutes.	30 minutes.	60 minutes.	24 heures.
Phénol.....	11,25	9,5	6,5	6,5	3,5
HgCl ²	0,45	0,30	0,15	0,05	0,01
Iode.....	0,011	0,011	0,010	0,008	0,0045

Il ressort nettement des valeurs données dans ce tableau que l'augmentation du temps de contact entre l'antiseptique et les germes correspond à un abaissement de la dose antibiotique, c'est-à-dire à une augmentation du pouvoir antibiotique, pour les trois substances essayées.

D'autre part, dans des essais effectués non plus sur une forme végétative, mais sur des spores de *Bacillus subtilis*, nous avons obtenu des résultats concordants encore plus nets. Ces derniers essais ont été effectués avec le bichlorure de mercure et avec diverses substances halogénées. Les résultats obtenus sont donnés dans le tableau suivant :

TABLEAU XIX

INFLUENCE SUR L'ESSAI ANTIBIOTIQUE DE LA DURÉE DE CONTACT ENTRE L'ANTISEPTIQUE ET LES GERMES SPORULÉS

Germe: Spores de Bacillus subtilis, en suspension dans l'eau distillée, à raison de 500 millions par centimètre cube. Température de l'essai: 20° C.

Désinfectants :	Doses antibiotiques (grammes).			
	Temps de contact.			
	15 minutes.	60 minutes.	12 heures.	36 heures.
Liquueur de Dakin (en Cl)		3,97	0,60	
Liquueur de Labarraque (en Cl)		6,0	1,3	
Eau de Brome (en Br)			2,1	
Eau iodo-iodurée (en I).....	5,4		1,07	0,27
HgCl ²	0,55		0,28	0,06

Il apparaît donc nettement, dans nos essais, que l'activité d'un désinfectant dépend, dans une très grande mesure, de son temps d'action. On serait tenté de penser qu'il existe entre les deux termes, activité et temps d'action, une proportionnalité fixe, c'est-à-dire que l'augmentation de l'activité désinfectante est toujours proportionnelle à l'augmentation de la durée d'action du désinfectant étudié. On pourrait, par exemple, penser qu'un désinfectant donné tuerait les germes à une dose dix fois moindre si on le laissait agir dix fois plus longtemps.

Malheureusement, il n'en est pas ainsi, et les faits sont beaucoup moins simples. Des exemples empruntés aux travaux d'autres auteurs, ou tirés de nos propres essais, vont nous montrer, d'une part, que l'influence du temps de contact sur l'activité désinfectante n'est aucunement régulière, et, d'autre part, que cette influence se fait sentir à des degrés très différents suivant les divers antiseptiques.

Les chiffres obtenus par Miss Chick, chiffres cités plus haut, montrent nettement le second de ces faits. Si l'on fait passer le temps d'action du phénol, de 2 minutes et demie à 10 minutes, la concentration par litre, efficace sur le bacille paratyphique, passe de 12 grammes à 10^g,4. La concentration active diminue donc de 13,3 p. 100. Dans le cas du bichlorure de mercure, cette diminution atteint 93,1 p. 100 (de 0,88 à 0,06), et, dans le cas de l'azotate d'argent, cette diminution est de 77 p. 100 (de 0,068 à 0,015).

De même, Clark (⁵³) a pu, au point de vue qui nous intéresse, remarquer des différences nettes entre le phénol et le bichlorure de mercure, dans leur action désinfectante vis-à-vis du bacille typhique. Il remarqua que le phénol agissait rapidement à concentration élevée (la concentration de 14 p. 1.000 était active en quelques minutes), mais que son action diminuait rapidement par dilution, de telle sorte que, à la concentration de 5 p. 1.000, le phénol se montrait inactif, même après un contact très prolongé. Le sublimé, au contraire, se montrait capable d'agir à très faible concentration, si son temps d'action était suffisamment prolongé. Ainsi, en 2 minutes et demie, la concentration active du sublimé était de 1/1.000; en 22 minutes, elle était de 1/20.000, et, si l'action était prolongée pendant 24 heures, une concentration de 1/1.000.000 devenait suffisante.

Examinons maintenant nos propres essais. Dans ce but, portons sur des graphiques les valeurs numériques données dans le tableau XVIII. En portant sur l'axe des abscisses les temps d'action des désinfectants, et sur l'axe des ordonnées les valeurs obtenues pour les doses antibiotiques, nous obtenons les courbes suivantes (fig. 5).

Ces courbes présentent toutes les trois une allure analogue. Pour chacune d'elles on constate, pendant les 30 premières minutes, une diminution de la dose antibiotique, c'est-à-dire une augmentation très nette de la valeur antiseptique, puis se produit un ralentissement de la plus-value antiseptique apportée par l'accroissement de la durée, à tel point que, pour le phénol, la dose antibiotique est la même pour les durées de 30 minutes et de 60 minutes. Il apparaît donc nettement, tout au moins pour les formes végétatives et pour les désinfectants étudiés, que c'est pendant les trente premières minutes que se fait sentir la plus grande partie de l'action antiseptique. Nous devons donc en conclure que

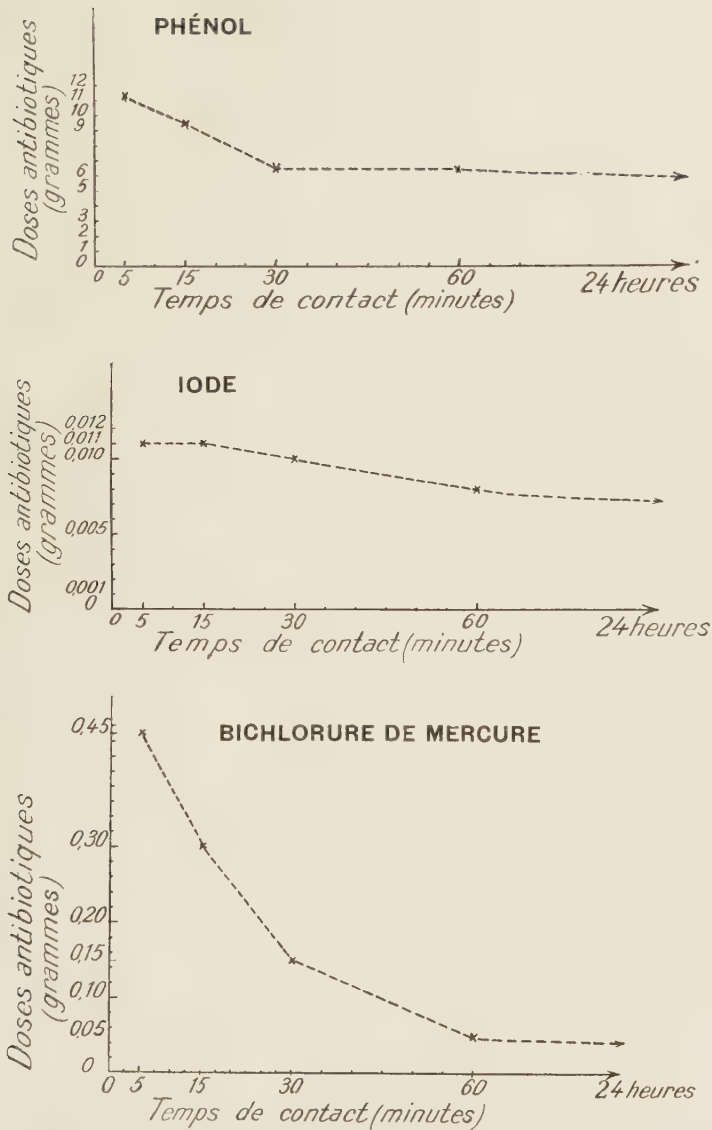


Fig. 5. — Influence des temps de contact entre le désinfectant et les germes sur la détermination de la dose antibiotique. (Milieu d'essai : eau distillée. Germes : staphylocoques dorés).

l'influence du temps de contact sur l'activité désinfectante *n'est aucune-ment régulière* : après quelques instants de contact, une durée supplémentaire de 5 minutes, par exemple, aura un effet beaucoup plus marqué que n'aurait, après un contact de plusieurs heures déjà, une durée supplémentaire d'une heure, par exemple.

Mais, si nous pouvons admettre pour les trois courbes une allure analogue, il ne s'ensuit pas que ces courbes soient superposables. Considérons, en effet, ainsi que l'a fait Clark, l'action du phénol et celle du sublimé. Nous constatons que l'augmentation d'activité du premier de ces corps est, pendant les trente premières minutes, beaucoup moins vive que l'augmentation d'activité du second. Nous constatons, de plus, que la dose liminaire du phénol est presque atteinte à cette 30^e minute, alors que, pour le sublimé, l'accroissement d'action est encore très net jusqu'à la 60^e minute, et continue même nettement après ce temps. Si nous comparons les doses antibiotiques aux différents temps, nous voyons, par exemple, que la diminution de la dose antibiotique est : pour le phénol, de 11g,25 à 6g,50 quand on passe de 5 à 60 minutes, et, pour le sublimé, de 0g,45 à 0g,05 dans les mêmes conditions. Pour l'iode, la diminution est intermédiaire (0g,011 à 0g,0045).

Il semble que nous tendions, vraisemblablement pour tous les antiseptiques, vers une dose seuil, dose liminaire, à partir de laquelle il devient inutile de prolonger la durée de contact. Nous pouvons peut-être penser que cette dose liminaire est liée à la quantité de matière microbienne en expérience, de telle sorte que les doses inférieures deviennent incapables d'assurer la stérilisation, soit qu'elles laissent intacts certains individus microbiens, soit qu'elles soient incapables de détruire complètement l'ensemble des germes. Quoi qu'il en soit, nous retrouvons donc, dans nos essais, les résultats déjà trouvés par Clark, et nous pouvons conclure que l'influence du temps de contact sur l'action antiseptique *se fait sentir à des degrés très différents pour les divers antiseptiques*.

Rappelons que nous avons déjà invoqué l'influence irrégulière du temps de contact sur l'action antiseptique, suivant les durées et suivant les antiseptiques considérés, contre les méthodes de mesure du « coefficient phénol »; nous pouvons, maintenant, comprendre beaucoup mieux cette objection. En effet, si nous nous reportons aux valeurs obtenues par Miss Chick, nous voyons que le coefficient phénol du bichlorure de mercure est 13,6, lorsque le temps d'action choisi pour la détermination est de 2 minutes et demie, qu'il est 173 pour un temps de 10 minutes, et 550 pour un temps de 30 minutes. Ceci ne saurait plus nous étonner, maintenant que nous savons que la prolongation des durées de contact, surtout pendant les 60 premières minutes, favorise beaucoup plus l'action du bichlorure de mercure que celle du phénol. Il en résulte avec la plus grande netteté, que le coefficient phénol n'a de valeur que pour un temps d'action absolument déterminé, et que l'essai comparatif avec le phénol n'atténue en rien, et même aggrave les erreurs qui proviennent d'une mesure imprécise des durées de contact.

Il nous reste maintenant à examiner *quel temps nous devons choisir* pour nos essais de mesure des actions antibiotiques.

Les précédents auteurs ont tous choisi des temps compris entre 5 et 30 minutes. Ainsi, Rideal et Walker adoptèrent un temps compris entre 5 minutes et 7 minutes et demie, Miss Chick proposa un temps de 30 minutes, les auteurs de la méthode de l'« Hygienic Laboratory » des temps de 2 minutes et demie et 15 minutes, les auteurs de la méthode du *Lancet*, des temps de 2 minutes et demie et 30 minutes; Reddish, un temps de 10 minutes, etc...

Nous devons dire, au risque de nous répéter, que le temps de contact choisi doit être parfaitement défini, et que c'est une faute évidente de choisir, comme l'ont fait les auteurs des méthodes du « coefficient phénol », des temps susceptibles de varier d'un tiers de leur valeur (puisqu'ils laissent une latitude de 5 minutes à 7 minutes et demie au temps efficace).

Par nos propres essais, nous avons vu que les courbes d'action de trois antiseptiques différents présentaient une allure analogue, montrant, dans une première partie, une augmentation vive de l'action antiseptique, et, dans une deuxième partie, une augmentation ralentie. Le temps que nous allons choisir doit, évidemment, être suffisamment long pour que l'action antiseptique ait le temps de se faire sentir nettement. Mais le choix d'un temps constant, qui corresponde à toutes les exigences, est rendu bien difficile par le fait que les divers antiseptiques n'agissent pas tous, comme nous venons de le voir, avec la même rapidité. On risque donc, en choisissant un temps trop long ou trop court, de favoriser les uns aux dépens des autres. Si nous n'avions à étudier que des antiseptiques relativement lents, comme le sublimé, le temps choisi pour leur action devrait atteindre 30 minutes et même 60 minutes. Mais pour des antiseptiques plus rapides, comme le phénol et l'iode, des temps de 15 ou de 30 minutes sont nettement suffisants. La seule façon de faire un choix logique, entre des temps de 15, 30 et 60 minutes, qui sont, d'ailleurs, sensiblement du même ordre, c'est de s'arrêter à des considérations pratiques. D'une part, le temps choisi doit correspondre aux conditions pratiques d'utilisation des antiseptiques, et, d'autre part, il doit être adapté à la réalisation d'essais en série au laboratoire. A ces deux points de vue, la durée de contact de 60 minutes, qui est théoriquement acceptable, est pratiquement trop longue : il est généralement nécessaire d'obtenir la destruction des germes (stérilisation extemporanée des eaux, stérilisation des traces des crachats, etc...), en un temps plus court que 60 minutes. Par ailleurs, les antiseptiques utilisés pour la désinfection des plaies ou des champs opératoires doivent agir très rapidement, puisque, à part des cas exceptionnels (irrigation continue), la stérilisation doit être assurée par une seule application ne dépassant pas généralement 15 minutes. Enfin, si les antiseptiques que nous avons considérés ici sont stables, il est possible que nous ayons à utiliser des antiseptiques peu stables par eux-mêmes (H_2O_2), ou qui se détruisent assez rapidement au contact de l'air humide ou chargé de CO_2 .

Pour ces raisons et pour assurer la réalisation facile au laboratoire de nos essais en série, nous avons choisi, comme temps de contact, le temps de 15 minutes.

Notons, d'ailleurs, que ce temps n'a rien d'absolu et qu'il peut être modifié à volonté selon la nature de l'antiseptique à mettre en expérience et selon sa destination pratique. Mais il est évident que la comparaison de l'antiseptique à l'étude avec un désinfectant d'activité connue n'est valable qu'au seul cas où les deux substances ont été essayées avec des durées de contact absolument égales. De plus, dans le cas des essais effectués avec des formes sporulées, il est fort difficile, en raison de la trop grande résistance de ces éléments, d'arriver à une stérilisation en 15, et même en 30 ou 60 minutes, avec des doses d'antiseptiques expéri-

mentalement et pratiquement utilisables. C'est pourquoi nous avons choisi, pour ces essais, un temps beaucoup plus long qui a, après expérimentation, été fixé à *12 heures*.

V. — FACTEURS POUVANT MODIFIER LA DEUXIÈME PHASE DE L'ACTION ANTIBIOTIQUE: L'ESSAI DE SURVIE DES GERMES. CONDITIONS DE LA SUBCULTURE

Nous venons d'examiner successivement comment il convient de définir les principaux facteurs en jeu dans l'action d'un désinfectant pour assurer à son essai le maximum de certitude. Nous avons étudié ce qui concerne le désinfectant, le microbe en expérience, et le milieu où se fait le contact de ces deux termes. Nous avons également examiné l'influence exercée par la température de l'essai, et choisi le temps d'action du désinfectant.

Il nous reste maintenant à examiner un dernier facteur, lié cette fois à la phase finale de l'essai antibiotique, phase où il s'agit de discerner si les germes traités par le désinfectant, dans les conditions ci-dessus décrites, ont été ou non définitivement détruits. Nous allons voir que l'on utilise dans ce but des *milieux* dits de *subculture*, et nous examinerons quelles conditions doivent remplir ces milieux pour assurer le développement des germes non détruits. Nous allons donc étudier successivement :

1° *Quels milieux* il convient de choisir pour y cultiver les germes traités, *quelles qualités chimiques et physiques* doivent présenter ces milieux ;

2° *Quelle quantité de germes* l'on doit ensemercer dans ces milieux ;

3° Pendant combien de *temps* il faut observer ces milieux, placés à l'étuve à 37° C, avant de conclure à la mort des germes qui y ont été ensemencés.

Milieux choisis pour l'essai de survie des germes traités par le désinfectant.

Pour essayer la vitalité des germes traités par un désinfectant, les premiers auteurs n'envisageaient qu'un moyen : ensemercer ces germes sur des milieux de culture artificiels et constater le développement éventuel de ces germes. Plus tard, à mesure que les germes pathogènes furent mieux étudiés, et que l'on connut mieux l'action nocive qu'ils exercent sur l'organisme animal, on imagina de chercher la survie des germes traités par le désinfectant en inoculant ces germes à un animal approprié. D'autres auteurs, cependant, de beaucoup les plus nombreux, continuèrent à utiliser les subcultures en milieux artificiels. Examinons ce point d'un peu plus près.

Geppert ⁽¹¹³⁾, en 1890, le premier, préconisa la subculture sur animal. A sa suite, M. Hahn ⁽¹²⁵⁾ (1922), Müller ⁽²⁰¹⁾ (1923), Neufeld ⁽²⁰²⁾, North et Pack ⁽²⁰⁶⁾ (1927) considérèrent l'essai *in vivo* comme plus sensible que l'essai *in vitro*. Il leur sembla que les bactéries considérées comme mortes par essais sur milieux artificiels étaient parfois capables, inoculés à un animal, de produire des infections.

D'autres auteurs, tout en reconnaissant toute la valeur de l'essai sur l'animal, émirent des opinions moins catégoriques que les auteurs précédemment cités : Bleyer ⁽²⁶⁾ (1923), Demels ⁽⁷⁷⁾ (1927), considérèrent comme égale la sensibilité des deux sortes de milieux. Stockmeyer ⁽²⁸⁴⁾, en 1925, admit bien, lui aussi, que l'inoculation à l'animal pouvait permettre le développement de germes incapables de se développer sur milieux de subculture, mais il conseilla pourtant d'utiliser de préférence l'essai *in vitro*, en raison de la bien plus grande régularité des résultats ainsi obtenus.

D'autre part, un grand nombre d'auteurs, parmi lesquels nous pouvons citer : V. Behring ⁽¹⁶⁾ (1890-1894), V. Grüber ⁽¹¹⁹⁾ (1891), Hammer ⁽¹³⁰⁾ (1892), Gegenbauer et Reichel ⁽¹¹⁰⁾ (1913), Müller (1923), B. Lange ⁽¹⁷¹⁾ seul et avec Keschichian ⁽¹⁵⁶⁾ (1923), préférèrent nettement l'essai sur milieux de culture.

A notre point de vue, nous pensons que l'essai sur animal peut être conservé pour discerner la survie de certains germes. Il nous paraît, ainsi, utile de compléter, pour le bacille tuberculeux, l'essai *in vitro* par un essai sur animal sensible, le cobaye par exemple. Cependant, dans l'essai sur l'animal, interviennent, comme dans tout essai sur matériel vivant, des différences de réaction imprévisibles et inévitables. Nous sommes donc en droit de considérer les résultats obtenus *in vitro* comme beaucoup plus réguliers que ceux obtenus par essai sur animal. D'autre part, la valeur des renseignements obtenus sur milieux de culture est beaucoup plus générale que celle des résultats sur animal, étant donné que chaque espèce animale présente une spécificité toute particulière à l'action des diverses bactéries. De plus, l'essai sur animal est évidemment beaucoup moins simple à réaliser que l'essai *in vitro*. Enfin, nous estimons que ces deux essais ne sont pas absolument comparables : que le pouvoir pathogène soit ou non détruit, si la vitalité d'un germe subsiste, nous le voyons par ensemencement sur milieux de culture. Que le pouvoir pathogène soit diminué sans que la vitalité soit complètement détruite, il nous est impossible de voir si le germe se développe dans l'organisme animal. Certes, on pourrait faire à cette dernière remarque l'objection qu'il n'est pas nécessaire que les germes soient complètement détruits, si leur pouvoir pathogène est supprimé. Mais il suffit de penser à la facilité avec laquelle se produisent chez les germes de brusques changements pour envisager la possibilité d'une reprise du pouvoir pathogène ; il est donc prudent de vérifier la complète destruction des germes. Pour ces diverses raisons, nous avons donc adopté comme milieux de subculture des *milieux artificiels*.

Mais il faut évidemment que ces milieux soient aussi favorables que possible à la multiplication microbienne, d'autant plus que nous cherchons à obtenir le développement de germes souvent fort affaiblis, sans être, pour cela, détruits complètement par l'action antiseptique.

Parmi les milieux de culture que nous pouvons utiliser, deux catégories s'offrent à nous : les milieux solides et les milieux liquides. Les premiers bactériologistes ont rapidement remarqué que les milieux liquides paraissaient plus favorables à la poussée microbienne que les milieux solidifiés. Hueppe ⁽¹⁴⁶⁾, V. Behring ⁽¹⁶⁾, V. Esmarch ⁽⁹⁴⁾ abandonnèrent ainsi les plaques de gélatine proposées par R. Koch, pour utiliser des bouillons de culture. V. Grüber ⁽¹¹⁹⁾, en 1891, après avoir formellement démontré la supériorité des milieux liquides, préconisa, comme milieu de subculture, un bouillon additionné de sérum.

Les milieux liquides ont donc été par la suite, adoptés par la presque totalité des auteurs. Seuls les bactériologistes, qui, à la suite de Geppert, ont suivi systématiquement la marche de la destruction des germes dans le temps, ont utilisé comme milieu de subculture des milieux solidifiés à base de gélose (Geppert) ou de gélatine (Heraus, 1886), pour pouvoir connaître le nombre des bactéries survivantes à un moment donné.

Pour notre part, nous pensons que les milieux liquides sont nettement plus favorables à la multiplication microbienne que les milieux solides. Nous en avons comme preuve récente les résultats trouvés par J. Régnier et ses élèves, d'après lesquels ne réussissent à se développer sur des milieux solidifiés qu'une partie des germes qui peuvent le faire dans les milieux liquides, et d'après lesquels, encore, la multiplication sur milieux solides présente même un retard (phase de latence) sur la multiplication en milieux liquides, qui se produit dès l'ensemencement.

Nous avons donc utilisé comme milieux de subcultures des milieux de culture liquides.

Voyons maintenant à quels milieux liquides il fallait nous adresser : Les auteurs, tels que Grüber, avaient simplement préconisé le bouillon de culture habituel.

D'autres auteurs, comme K. Süpfle et A. Dengler ⁽²⁸⁸⁾, ont spécialement étudié le rôle de la qualité du milieu de subculture sur le résultat de l'essai d'un désinfectant. Ils ont, à la suite de travaux en série, préconisé d'améliorer la qualité des milieux de subculture en y ajoutant des substances sucrées, ou, dans certains cas, des substances albumineuses spécialement choisies. Ils ont déterminé les concentrations optima de ces substances pour le développement de certains germes.

Ainsi, ils ont préconisé comme milieu optimum, pour le staphylocoque, un bouillon glucosé à 3 p. 100, milieu déjà proposé par Göbel en 1913, pour le colibacille, un bouillon glucosé à 1 p. 100 ; pour le streptocoque, un bouillon glucosé à 5 p. 100 additionné de sérum (1 p. 100) ; pour le bacille du charbon, un bouillon glucosé à 3 p. 100 additionné de sérum (5 p. 100).

Seligmann ⁽²⁷⁶⁾, en 1922, effectua des essais comparatifs en utilisant soit le bouillon ordinaire, soit les milieux de Süpfle ⁽²⁸⁷⁾ comme milieux de subculture. Il ne put constater de grandes différences dans les résultats, dans le cas de la méthode des suspensions. Mais il insista surtout sur la nécessité de fixer le pH des milieux, et conseilla comme milieux optima, pour le staphylocoque, le colibacille, le bacille pyocyanique et le bacille du charbon, des milieux de pH 7,6 à pH 8,0.

Moore ⁽¹⁹⁷⁾, en 1926, insista également sur l'imprécision du pH des milieux utilisés dans la technique de Rideal et Walker. Par contre,

Amster ne reconnut pas au pH des milieux une bien grande influence.

Lange, en 1923, effectuant des essais de désinfection du staphylocoque, avec du crésol à 0,4 p. 100, observa les faits suivants : en utilisant comme milieu de subculture du bouillon de viande de cheval, avec ou sans glucose, il se produisait, après une désinfection durant seulement 10 minutes, un retard de poussée de plus de 24 heures. En utilisant comme milieu de subculture, du bouillon additionné de sérum, il ne se produisait, après 30 minutes d'action désinfectante, aucun retard de poussée. Les bouillons additionnés de sérum semblaient donc plus favorables au développement des germes.

De même, Isaacs ⁽¹⁵⁰⁾, en 1930, put constater que l'utilisation, pour les subcultures, de milieux plus riches en matières nutritives, entraînait un accroissement apparent du temps nécessaire à la désinfection.

Pour nous, nous avons utilisé, pour nos subcultures, les milieux mêmes qui nous avaient antérieurement servi à cultiver les germes pour l'essai, c'est-à-dire le bouillon ordinaire, très généralement. Nous l'avons utilisé, le jugeant suffisamment favorable, afin de satisfaire une exigence que nous expliquerons plus loin. Nous avons voulu, en effet, employer, pour les subcultures, le milieu même utilisé pour l'essai antigénétique, afin que la phase finale de l'essai antibiotique fût en tous points comparable à l'essai antigénétique.

Une deuxième condition, importante pour la bonne marche de la phase finale de l'essai antibiotique, est la *nécessité d'observer les subcultures pendant un temps suffisamment long*, avant de conclure à l'incapacité de développement des germes qui y sont ensemencés.

Dès longtemps, des observations ont été faites à ce sujet, particulièrement au sujet de l'essai de survie des germes traités par la chaleur. Eijkmann ⁽⁸⁹⁾, en 1908, en suivant la vitesse de destruction par la chaleur d'une souche de colibacille, observa que des numérations faites après 6 jours d'incubation étaient nettement plus élevées que celles faites après 2 jours. Delépine, en 1916, et Oerskov ⁽²¹⁰⁾, en 1925, trouvèrent des résultats semblables en opérant avec des cultures chauffées de bacilles tuberculeux. Isaacs, en 1930, observa des faits analogues sur des suspensions chauffées de colibacille, de streptocoque et de bacille tuberculeux. Des différences encore plus considérables dans les moments de croissance furent encore observées dans des essais de destruction par la chaleur de bacilles sporulés, essais effectués par R. Koch en 1881.

Dans le cas de la désinfection par les corps chimiques, des observations semblables ont pu être faites. Mais la question est ici compliquée par l'intervention des propriétés antigénétiques du désinfectant transporté dans la subculture. L'absence de poussée peut donc être due également à une post-action infertilisante du désinfectant entraîné ou fixé sur les germes. Nous aurons l'occasion d'insister particulièrement sur ce point dont nous avons déjà, à diverses reprises, mentionné l'importance.

ESSAIS PERSONNELS

Quoi qu'il en soit, pour notre part, nous avons pu constater que le développement des germes dans les subcultures était parfois très tardif. Ceci nous est apparu spécialement dans des essais de pouvoir antibiotique du bichlorure de mercure. Dans le cas de cet antiseptique, nous avons donc pris l'habitude d'observer les subcultures pendant huit jours, bien que les résultats aient été généralement stabilisés après le quatrième jour. Pour les autres désinfectants, nous n'avons guère observé de changements dans les résultats après le deuxième jour de la subculture ; nous avons, cependant, toujours observé nos subcultures pendant *quatre jours* au minimum.

Enfin, constatant que les divers auteurs repiquaient, dans les milieux de subculture, des proportions diverses et souvent variables des germes traités par l'antiseptique (Miss Chick et Martin repiquaient 1/300 des germes traités ; Rideal et Walker, une anse de platine de 2 millimètres sur 5 centimètres cubes de milieu d'essai ; les auteurs de la méthode de l'« Hygienic Laboratory » ainsi que Reddish, une anse de platine de 4 millimètres sur 5 centimètres cubes de milieu d'essai ; les auteurs de la méthode du *Lancet*, 1/60 des germes traités), nous avons voulu rechercher si ce point particulier n'avait pas plus d'importance que ne lui en avaient donné les précédents auteurs. Pour voir, donc, si la variation de la quantité des germes repiqués dans les subcultures après le traitement par l'antiseptique pouvait modifier les résultats de l'essai, nous avons effectué l'expérience suivante : nous avons déterminé en série, selon notre technique habituelle, les doses antibiotiques d'une substance chimique, en prélevant pour la subculture des quantités différentes des germes traités. Après avoir laissé 15 minutes en contact la substance désinfectante et une suspension de staphylocoques, contenant par centimètre cube 500 millions de germes, nous avons prélevé dans le mélange, et repiqué en bouillon, les quantités suivantes :

1/5 de centimètre cube, soit 100 millions de germes sur 2 500 millions de germes mis en expérience.

1/10 de centimètre cube, soit 50 millions de germes sur 2 500 millions de germes mis en expérience.

1/100 de centimètre cube, soit 5 millions de germes sur 2 500 millions de germes mis en expérience.

Ces diverses quantités ont chacune été ensemencées dans 5 centimètres cubes du milieu de subculture.

Le désinfectant choisi pour ces essais a été la solution iodo-iodurée contenant 1 p. 100 d'iode. Avec cette substance, en effet, fortement antibiotique, agissant donc à très faible concentration, nous étions assurée de ne pas transporter dans les subcultures, même avec le plus fort prélèvement (1/5 de centimètre cube), une quantité de substance antisept-

tique supérieure à la dose antigénétique, et, par suite, capable de s'opposer au développement des germes survivants.

Les résultats obtenus dans ces essais sont donnés dans le tableau suivant. Les valeurs données représentent toutes la moyenne de dix essais au moins.

TABLEAU XX

INFLUENCE SUR L'ESSAI ANTIBIOTIQUE DE LA QUANTITÉ DE GERMES ENSEMENCÉE DANS LA SUBCULTURE.

Germes: Staphylococcus aureus en suspension dans l'eau distillée, à raison de 500 millions par centimètre cube. Temps d'action du désinfectant: 15 minutes. Température de l'essai: 20° C.

Désinfectant : Iode (solution iodurée).	Quantité du mélange : suspension microbienne-désinfectant prélevée pour les subcultures.		
	1/5 de cm ³ .	1/10 de cm ³ .	1/100 de cm ³ .
Dose antibiotique (grammes)..	0,023	0,020	0,010

Ainsi, lorsqu'on repique dans les subcultures une proportion plus faible des germes traités, on obtient comme valeur antibiotique des chiffres plus petits. Il semble que ceci soit dû au fait qu'avec les petits prélèvements il nous arrive de laisser, hors du contrôle, les germes les plus résistants. Par suite de l'hétérogénéité de la suspension microbienne, plus l'échantillon prélevé est petit, moins nous avons, dans cet échantillon, l'image exacte de l'ensemble. Il importe donc non seulement de prendre pour le repiquage une proportion absolument constante des germes traités par le désinfectant, mais il est nécessaire de prendre cette proportion la plus grande possible. L'idéal serait évidemment de repiquer dans les subcultures la totalité des germes traités par l'antiseptique. Nous verrons plus tard, quand nous exposerons la deuxième technique que nous avons mise au point, que nous sommes arrivée à réaliser ce point difficile. Pour le moment, où nous étudions plus spécialement les facteurs qui influencent la première technique que nous avons mise au point, voyons comment nous avons pu nous dégager de la difficulté que nous créent les deux obligations contradictoires de repiquer la plus grande quantité possible des germes traités, et de transporter la plus petite quantité possible de la substance antiseptique dans le milieu de subculture.

Si nous considérons les résultats du tableau xx, nous voyons non seulement que la dose antibiotique obtenue diminue graduellement lorsque les quantités prélevées pour les subcultures décroissent, mais nous voyons aussi que la différence entre les doses correspondant à des prélèvements de 1/5 et de 1/10 de centimètre cube est beaucoup moins accentuée que celle qui correspond aux prélèvements respectifs de 1/10 et de 1/100 de centimètre cube. Il est évident que la dose antibio-

tique correspondant au prélèvement de 1/100 de centimètre cube est beaucoup trop faible pour que nous puissions adopter cette quantité, et ceci d'autant plus que la mesure exacte d'un aussi petit volume est pratiquement bien difficile. Les valeurs antibiotiques obtenues avec les prélèvements de 1/10 et de 1/5 de centimètre cube sont peu différentes ; par ailleurs, le prélèvement de 1/10 de centimètre cube assure le transport dans les subcultures d'une quantité d'antiseptique deux fois plus petite. Enfin, et nous insisterons tout particulièrement sur ce point dans le paragraphe suivant, le prélèvement de 1/10 de centimètre cube du mélange (contenant 500 millions de germes par centimètre cube), entraîne 50 millions de germes qui, ensemencés dans 5 centimètres cubes de bouillon de subculture, donnent dans ce milieu une concentration en germes de 10 millions par centimètre cube. Or, c'est précisément cette concentration qui a été utilisée pour mesurer, selon notre technique, le pouvoir antigénétique des substances désinfectantes, ce qui nous permet, comme nous le verrons plus loin, d'obtenir des renseignements extrêmement importants.

Pour ces diverses raisons, nous avons, pour la première méthode de mesure du pouvoir antibiotique que nous présentons, choisi 1/10 de centimètre cube comme volume de mélange désinfectant-suspension microbienne à repiquer dans les subcultures.

Nous venons d'examiner quelle influence exerçaient différents facteurs sur les résultats trouvés dans la mesure du pouvoir antibiotique. Nous avons ainsi étudié successivement l'action exercée par la variation :

- 1° Des *qualités de la solution désinfectante* ;
- 2° Des *quantités de germes en expérience* ;
- 3° Des *qualités* (espèce, souche, âge, milieu de suspension) de ces germes ;
- 4° De la *constitution du milieu intermédiaire* ;
- 5° De la *température de l'essai* ;
- 6° Du *temps de contact* entre l'antiseptique et les germes ;
- 7° Des *conditions* dans lesquelles sont effectuées les *subcultures*.

Pour chacun de ces facteurs, nous avons défini une valeur fixe qui nous a paru la plus favorable possible au but poursuivi. Dans tous ces essais, nous avons utilisé, pour la détermination des doses antibiotiques, la première des méthodes que nous examinerons plus loin, au troisième chapitre. Cette méthode consiste, en principe, à rechercher la dose antibiotique d'une substance antiseptique donnée vis-à-vis d'un microbe donné. Chercher la dose antibiotique consiste essentiellement à faire agir sur le germe des quantités croissantes de la substance antiseptique considérée, et à trouver la dose la plus faible qui est capable de détruire définitivement les germes, dans les conditions que nous nous sommes fixées. C'est précisément cette dose qui est la dose antibiotique de la substance étudiée. Ainsi, quand nous étudierons, au troisième chapitre, notre méthode de mesure de la valeur antiseptique, où tous les autres facteurs sont fixés, nous verrons que nous faisons varier uniquement la concentration de l'antiseptique étudié, afin de trouver parmi les doses mises en expérience la dose antibiotique. Dans les essais que nous venons de passer en revue au cours de ce chapitre, nous avons toujours

procédé ainsi, même quand nous voulions connaître l'influence exercée sur le pouvoir antibiotique par la variation d'un quelconque des facteurs examinés. Nous nous sommes bornée à choisir, pour chacun de ces facteurs, différentes valeurs et, pour chacune de ces valeurs, nous avons cherché, comme nous venons de le dire, la dose antibiotique. *Nous avons donc toujours admis comme variable utile : la concentration de la substance antiseptique*, et, jusqu'ici, nous avons raisonné comme si ce choix s'imposait d'une façon évidente. Le moment est venu de montrer que ce choix ne s'est pas imposé à tous les auteurs et qu'il a nécessité une justification expérimentale.

VI. — DU CHOIX DE LA VARIABLE DANS LA MESURE DE L'ACTION ANTIBIOTIQUE

Afin de bien comprendre quelle idée nous a guidée pour choisir comme variable utile de l'action désinfectante les doses de substance antiseptique en réaction, il nous faut, de nouveau, pénétrer dans l'intimité de l'action désinfectante, et chercher à avoir une conception qualitative-ment et quantitativement exacte de ce que nous voulons au juste mesurer dans cette action.

On peut définir l'action antimicrobienne comme l'action nuisible qu'exerce une substance donnée sur l'activité de germes donnés. Cette définition laisse supposer que cette action peut être graduelle et produire des effets de plus en plus marqués, avant et jusqu'à la mort de la bactérie comprise. Nos propres essais nous ont, d'ailleurs, imposé l'obligation de tenir compte de ce degré d'action, puisque, à côté de la dose antibiotique, ou dose qui tue, nous cherchons à mesurer la dose antigénétique, plus faible, qui, sans détruire la vie des germes, se contente d'empêcher leur multiplication.

On peut donc concevoir l'existence, dans l'action antimicrobienne, de degrés mesurables, et envisager la possibilité, pour distinguer ces degrés, de mesurer l'action progressive de la substance antiseptique, par la diminution graduelle correspondante d'une des fonctions vitales du microbe, de sa fonction respiratoire ou de sa fonction fermentative, par exemple. La mesure de la valeur antiseptique d'un produit serait alors, théoriquement, basée sur la mesure de cette action biologique ; il en résulterait l'établissement de relations numériques, facilement traduites par une courbe, exprimant l'intensité de l'action produite en fonction de la dose d'antiseptique en jeu. Cette courbe, spéciale pour chaque substance et pour chaque germe, serait très analogue aux courbes action-concentration que certains auteurs ont pu établir pour caractériser l'activité pharmacologique d'une substance donnée. Elle se rapprocherait, par exemple, des courbes données par Storm von Leuwen ⁽²⁸⁹⁾ (1919) pour l'action des hypnotiques et des narcotiques, et des courbes présentées par J. Régnier ⁽²³⁸⁾ pour l'action des anesthésiques locaux, mesurée par la baisse de la chronaxie.

Ces courbes donnent une vue d'ensemble sur l'action exercée par la

substance : on y trouve l'indication de la dose qui commence à agir, des doses (les plus favorables aux mesures pharmacologiques) qui produisent une action tout à fait nette, et aussi, tout au moins dans certains cas, l'indication des doses qui fournissent l'action maxima, et qui seraient évidemment pour nous les doses antibiotiques.

Dans le cas qui nous occupe ici, il nous serait peut-être possible d'arriver à établir une courbe action-concentration, en nous basant sur des essais tels que ceux de Lipschitz ⁽¹⁸¹⁾ (1923) qui a suivi l'action antiseptique par la mesure de la respiration cellulaire, de V. Euler ⁽⁹⁶⁾, de Niehammer ⁽²⁰⁵⁾ et ses collaborateurs, qui, dans la recherche du facteur Z notamment, ont mesuré le dégagement du CO² produit par la levure, et sa diminution sous l'influence des antiseptiques. Mais un certain nombre d'objections pourraient être élevées contre cette conception :

1^o Dans cette détermination, il ne pourrait s'agir d'une loi simple de diminution de l'activité cellulaire ; en effet, les actions antiseptiques sont compliquées par le fait que se trouvent en jeu, non pas une cellule, ni un nombre relativement restreint de cellules, mais un nombre extraordinairement grand, et surtout par l'existence de différences naturelles ou acquises, parfois fort grandes, de résistance aux antiseptiques. Il s'ensuivrait vraisemblablement qu'à une diminution donnée de l'activité des germes, mesurée par un test biologique, ne correspondrait pas une diminution réelle de l'activité de toutes les cellules. En admettant que la mesure soit valable pour la majorité des cellules, il y en aurait certaines dont l'activité serait totalement supprimée, et certaines autres dont l'activité serait absolument conservée intacte. De ce fait, le problème présenterait donc une grande complexité.

2^o Mais l'objection principale que nous pouvons faire à cet essai est qu'il nous entraînerait totalement hors des conditions posées dans notre définition, puisque nous ne mesurerions plus l'action nuisible exercée sur la vitalité du germe, mais l'action nuisible exercée sur les diastases bactériennes, exogènes ou endogènes, dont l'existence peut être, même dans ce dernier cas, indépendante de la cellule microbienne.

Nous devons donc renoncer à ce mode d'estimation de l'action antimicrobienne par établissement d'une courbe action-concentration, mode qui est certainement le moins critiquable de tous ceux présentés pour la mesure d'une action pharmacologique.

Voyons de quelle autre façon nous pouvons concevoir le problème.

Renonçant à suivre, du début à la fin, l'action de doses croissantes de l'antiseptique, nous pouvons choisir, parmi ces actions graduelles exercées par l'antiseptique, l'une d'elles bien déterminée, l'action seuil, que nous prendrons comme test. C'est précisément l'action la plus forte que puisse exercer sur les germes la substance chimique, c'est la destruction totale de leur vitalité. Ceci nous ramène donc à la mesure d'une action toxique. Mais cette mesure est ici beaucoup plus complexe qu'elle ne l'est sur les animaux supérieurs, car la destruction des organismes considérés ne peut être observée directement, et elle doit être mise en évidence par une opération complémentaire.

Si nous considérons maintenant l'action exercée par la dose liminaire sur une seule cellule microbienne, cette action est, par définition, la

dose létale, mais il ne faut pas oublier que cette action létale nécessite, pour s'exercer, un certain laps de temps. Il faut, en effet, que la dose nécessaire se fixe sur la cellule, qu'elle en traverse les couches externes et détruise enfin la cellule, par précipitation des constituants cellulaires ou par un autre processus. Ce facteur temps est, d'ailleurs, d'autant plus important ici que l'action antiseptique s'exerce, comme nous avons eu tant de fois l'occasion de le répéter, sur un très grand nombre de cellules microbiennes douées de résistances très variables. Pour atteindre l'action seuil, nous devons donc considérer deux facteurs : la dose et le temps.

Si nous envisageons les faits le plus simplement possible, nous pouvons obtenir de deux façons la réalisation de cette action seuil :

1^o Nous pouvons fixer un temps d'action et faire varier la dose d'antiseptique en réaction, afin de chercher la concentration liminaire ;

2^o Nous pouvons fixer la concentration de l'antiseptique en expérience et faire varier le temps d'action, afin de chercher le temps liminaire ;

3^o Nous pouvons, enfin, laisser varier à la fois le temps d'action et la concentration.

Nous allons voir à laquelle de ces trois possibilités il convient de s'arrêter :

1^o Certes, nous avons des exemples connus d'essais dans lesquels sont laissés variables *la dose de la substance réagissante et le temps de son action*. Qu'il nous suffise de citer, au point de vue pharmacologique général, la méthode d'estimation des drogues digitaliques mise au point par Focke, et de rappeler ce que nous avons vu, pour le cas qui nous occupe ici, dans les méthodes du coefficient phénol. Remarquons, d'ailleurs, que, dans les exemples cités, les auteurs ne cherchaient pas des valeurs absolues, mais des valeurs comparatives rapportées, dans le premier cas, à une poudre de digitale étalon, et, dans le deuxième cas, au phénol. D'autre part, les auteurs ne concevaient pas une variation illimitée du temps, puisque Focke ⁽¹⁰²⁾ avait défini le temps nécessaire à l'arrêt du cœur de grenouille comme devant être compris entre 6 minutes et 15 minutes, et que Rideal et Walker considéraient comme concentration antiseptique intéressante celle qui détruisait les germes en un temps compris entre 5 minutes et 7 minutes et demie. Il semble que les auteurs aient voulu, en conservant un variable temps, se donner une marge plus large pour la recherche de la dose liminaire, et qu'ils aient cru avoir ce droit précisément parce que leurs essais étaient comparatifs.

Pour nous, qui cherchons non plus une valeur comparative, mais une valeur absolue, et qui tentons de l'obtenir aussi précise que possible, nous ne pouvons nous permettre une telle latitude dans le temps d'action et, quitte à rendre l'essai plus ardu, nous devons nous contenter de faire varier un seul facteur. Au surplus, nous considérons que la variation simultanée des deux facteurs ne peut que nuire à la compréhension simple des faits et à la sûreté des résultats.

2^o Peut-on prendre comme variable le *temps d'action*, après avoir fixé une concentration donnée pour l'antiseptique à l'étude ?

a) La première difficulté apportée par ce deuxième procédé est l'im-

possibilité de fixer une concentration donnée, utilisable indifféremment pour l'essai de toutes les substances antiseptiques. En effet, une concentration donnée (1 p. 1.000 par exemple), se montrerait, pour certains corps, totalement inactive, et, pour certains autres, beaucoup trop active. D'ailleurs, même en admettant cette possibilité, cette concentration agirait, pour certains corps, avec une violence telle qu'il deviendrait impossible de mesurer son temps d'action, et, pour d'autres corps, au contraire, elle nécessiterait un temps d'action infiniment trop prolongé pour correspondre aux nécessités pratiques.

Supposons enfin que, sans chercher à déterminer une valeur générale, nous voulions simplement comparer l'activité de deux substances voisines. Si l'une de ces substances : A, est active à une concentration deux fois plus faible que l'autre : B, rien ne nous permet de conclure que, si les deux substances sont prises à la même concentration, la substance A demandera, pour réaliser l'action seuil, un temps deux fois moins long que la substance B. Nos propres essais (p. 113) nous ont, en effet, montré que l'augmentation d'action due à une prolongation de temps n'est pas proportionnelle à l'accroissement de ce temps. Cela est si réel qu'à partir d'une certaine dose d'antiseptique l'augmentation du temps ne renforce plus l'action, ce qui tendrait à montrer que, même avec un temps d'action infiniment grand, il faudrait, pour chaque substance, une dose minima, au-dessous de laquelle l'action antiseptique ne se réalise plus. Ce fait, déjà signalé par Clark ⁽⁵³⁾, semble bien mis en évidence par les essais que nous avons exposés. Il nous paraît d'ailleurs logique, si nous considérons l'action antiseptique comme finalement réduite à une sorte d'action physique ou chimique, ou tout au moins à une réaction quantitative, où un poids donné de substance doit nécessairement agir pour détruire un poids donné de substance.

b) Une autre difficulté se présente du fait que les courbes que donnent, pour les différentes substances, les valeurs antibiotiques en fonction des temps d'action, et que nous pouvons appeler courbes action-temps, ne sont pas du tout superposables : chaque antiseptique possède, à ce point de vue, sa courbe d'action particulière, et il existe, comme nous l'avons vu, des antiseptiques à action rapide et des antiseptiques à action beaucoup plus lente. C'est pourquoi il nous semble difficile de trouver une formule mathématique générale, qui s'applique à l'action de tous les désinfectants, puisque les deux facteurs temps et concentration entrent obligatoirement dans l'établissement d'une telle courbe.

En tous cas, il semble inutile d'envisager la possibilité de mesurer les valeurs antimicrobiennes en se basant sur la variation du temps d'action.

3° Peut-on prendre comme variable la *concentration de la substance antiseptique*, après avoir fixé un temps d'action constant ?

Cette proposition nous semble non seulement beaucoup plus logique, mais infiniment plus facile à réaliser pratiquement. Le temps est, en effet, facile à fixer, puisqu'il correspond à des données pratiques. Il suffit de le choisir plus court ou égal aux temps nécessités en pratique pour que les résultats des essais soient significatifs. D'autre part, le temps étant fixé, il est toujours possible de trouver pour la substance à utiliser une dose active. Les seules limites de réalisation sont apportées

par des points de détail, comme des questions de solubilité par exemple, qu'il est facile de résoudre par addition d'un solubilisant approprié. Si, par hasard, on ne peut trouver pour l'antiseptique une dose capable d'agir en le temps fixé, pour peu que ce temps soit comparable au temps nécessaire en pratique, on en déduira l'inaptitude de ce corps à être utilisé pratiquement.

Quoi qu'il en soit, il nous semble donc nécessaire de laisser varier, pour l'essai, un seul des deux facteurs susceptibles de variation, et de choisir, comme variable utile, la concentration de la substance antiseptique.

Nous avons maintenant, semble-t-il, examiné toutes les conditions qui régissent la détermination de l'action antibiotique, et nous avons vu quelle variable il convenait de choisir pour étudier cette action. Il ne nous resterait donc plus qu'à définir notre méthode s'il ne subsistait encore, pesant sur nos résultats, le lourd problème de l'influence exercée sur la mesure du pouvoir antibiotique des substances antimicrobiennes par l'action antigénétique de ces substances. Il nous faut donc examiner de près cette question pour nous rendre compte de son importance et pour essayer de la résoudre. Mais, auparavant, nous devons encore examiner les conditions qui régissent la mesure du pouvoir antigénétique. Ces conditions sont, pour la plupart, les mêmes que celles qui ont été examinées au sujet de l'essai antibiotique. Certaines, cependant, lui sont particulières ; nous allons les examiner maintenant.

B. — CONDITIONS INFLUENÇANT PLUS PARTICULIÈREMENT LA DÉTERMINATION DU POUVOIR ANTIGÉNÉTIQUE

Rappelons que la détermination du pouvoir antigénétique d'une substance consiste à ajouter des quantités croissantes de cette substance à des milieux de culture ensemencés avec la même quantité, connue, de germes, et à noter pour quelle concentration du désinfectant étudié le développement des germes est empêché dans ce milieu.

Cet essai est donc plus simple que celui de détermination de la valeur antibiotique, puisqu'il ne nécessite pas l'observation d'un temps d'action constant du désinfectant, ni le transport ultérieur des germes dans un milieu de subculture. Ici, l'action inhibitrice du désinfectant a lieu dans le milieu de culture lui-même.

Parmi les facteurs susceptibles d'influencer cette détermination de la valeur antigénétique, nous retrouvons évidemment les facteurs principaux de l'essai antibiotique, à savoir :

a) Le désinfectant ; b) l'organisme utilisé pour l'essai ; c) le milieu où se fait leur contact, et qui n'est autre, ici, que le milieu de culture.

Les facteurs liés aux conditions extérieures sont un peu différents de ceux que nous avons examinés pour l'essai antibiotique. Sont seuls susceptibles d'intervenir ici :

d) La température de l'essai et, e) le temps durant lequel on observe les cultures avant de conclure.

a) En ce qui concerne le premier facteur, le *désinfectant*, ce que nous avons dit à propos de l'essai antibiotique s'applique également au cas présent. Nous devons cependant remarquer que la solution du désinfectant se fait, ici, non plus dans l'eau distillée, mais dans le milieu de culture même, c'est-à-dire dans un milieu chargé d'albumines et de sels. Aussi se forme-t-il parfois, pour certains antiseptiques, comme ceux du groupe des métaux lourds, par exemple, des précipités fort gênants. Par ailleurs, même en l'absence de cas précipités, il se produit des combinaisons de la substance chimique avec les albumines ou les sels, combinaisons qui absorbent une grande partie de la substance à essayer.

b) Pour le deuxième facteur, le *germe*, il faut évidemment utiliser des germes en pleine vitalité, provenant d'une souche soigneusement entretenue. Les remarques faites pour l'essai antibiotique sont ici parfaitement valables.

Par ailleurs, il semblerait que, dans ces milieux déjà chargés d'albumine, le nombre des germes en expérience doive être moins important que pour l'essai antibiotique, où nous opérons en eau distillée. Il n'en est rien, et les exemples ci-dessous donnés nous permettent, au contraire, de constater que la valeur de la dose antigénétique varie nettement selon le nombre des germes utilisés pour l'essai. Les valeurs que nous donnons dans le tableau suivant ont été déterminées selon la technique décrite au chapitre III. Mais, dans un cas, les doses antigénétiques ont été déterminées avec une concentration en germes de 10 millions par centimètre cube, et, dans l'autre cas, avec une concentration en germes de 500 millions par centimètre cube.

TABLEAU XXI

DOSES ANTIGÉNÉTIQUES VIS-A-VIS DU STAPHYLOCOQUE DORÉ

<i>Désinfectants :</i>	<i>Concentration en germes.</i>	
	10 millions par cm ³ .	500 millions par cm ³ .
	Doses antigénétiques.	Doses antigénétiques.
Eau de chlore (en Cl)	0,26	0,30
Liqueur de Dakin (en Cl)	0,39	0,75
Liquide de Labarraque (en Cl).....	0,26	0,67
Eau de Brome (en Br).....	0,68	0,70
Eau iodo-iodurée (en I)	0,40	0,80
Bichlorure de mercure	0,07	0,10
Phénol	2,6	3,6

Nous voyons donc que les doses antigénétiques sont nettement plus grandes quand elles ont été déterminées avec la concentration en germes la plus forte. Ceci provient évidemment du fait que chaque germe doit

absorber une quantité déterminée de substance antiseptique pour perdre la faculté de se multiplier.

Pour effectuer l'essai antigénétique, que nous définirons plus en détail au troisième chapitre, nous avons choisi comme concentration en germes 10 millions par centimètre cube. Ce nombre nous paraît, en effet, suffisamment grand pour que nous puissions espérer y trouver quelques-uns des germes les plus résistants. Par ailleurs, ce nombre est une fraction déterminée ($1/50$) du nombre de germes que nous mettons en expérience dans l'essai antibiotique (500 millions) ; ceci nous permettra, comme nous l'avons déjà noté, de nous retrouver absolument dans les mêmes conditions de nombre que pour l'essai antigénétique, dans la subculture qui termine l'essai antibiotique.

c) Le milieu d'essai, milieu de culture, doit évidemment être un milieu convenant parfaitement à la croissance des germes. Nous ne rappellerons pas ici ce que nous avons dit à propos des milieux de subculture. Le seul point sur lequel nous tenons à insister un peu est la nécessité d'amener le milieu au pH optimum.

Un certain nombre d'auteurs ont noté, en effet, le rôle important joué par la réaction du milieu sur l'action antigénétique ; Bonacorsi, en 1913, a montré que, puisque le pH optimum du milieu de culture variait d'un germe à l'autre, il fallait déterminer l'action antigénétique à des pH compatibles avec le bon développement des germes étudiés.

Fleicher et Amster⁽¹⁰¹⁾ (1922) notèrent l'influence du pH du milieu de culture sur l'activité antigénétique des substances colorantes. Seligmann⁽²⁷⁶⁾, la même année, étudia l'influence du pH du milieu de culture sur l'action antigénétique du bichlorure de mercure, du formol à 40 p. 100, et d'un crésol saponifié, vis-à-vis de différents germes (staphylocoque, bacille pyocyanique, colibacille). Il constata que l'action du pH se faisait sentir pour ces différentes substances d'une façon nette mais irrégulière. Ainsi, peu marquée dans le cas du crésol, cette influence se faisait sentir nettement pour le formol, et d'une façon encore plus intense pour le bichlorure de mercure. Pour ce dernier corps, et vis-à-vis des trois espèces bactériennes étudiées, l'activité antigénétique était abaissée lorsque les valeurs des pH augmentaient ; ainsi, la résistance des bactéries était maxima vers pH — 8,4 et minima vers pH — 6,4. D'autre part, dans le cas du formol, l'influence du pH variait selon les espèces microbiennes considérées. Le colibacille se montrait plus sensible aux pH inférieurs, ainsi que le staphylocoque, tandis que le bacille pyocyanique se montrait plus résistant aux pH moyens.

L'influence qu'exerce le pH du milieu de culture sur le pouvoir antigénétique est donc tout à fait importante. Il est donc nécessaire, non seulement de régler la réaction du milieu au pH optimum, mais encore de stabiliser autant que possible ce pH, de façon qu'il ne soit pas modifié par l'addition de la substance antiseptique, ou par la multiplication microbienne même. Aussi certains auteurs ont-ils pensé à utiliser comme milieux de culture des milieux tamponnés par addition de phosphates ou d'autres sels. Il est difficile de savoir jusqu'à quel point cette proposition se justifie ici. Il se peut, en effet, que l'addition de telles substances salines apporte, dans le milieu d'action de l'antiseptique, des facteurs

susceptibles de modifier l'action antigénétique pure de l'antiseptique étudié. D'autre part, les bouillons de culture que nous utilisons pour la mesure du pouvoir antigénétique sont, par leurs albumines et leurs peptones, riches en acides aminés, des milieux possédant déjà un certain pouvoir tampon. Enfin, il est bien rare que les antiseptiques essayés présentent les caractères de bases fortes ou d'acides forts. Nous pensons donc qu'il faut mieux, sauf exception, s'en tenir à des milieux de formule habituelle, milieux ayant pour seule caractéristique d'être de composition constante et d'être optima pour le développement des germes.

d) La *température* à laquelle est essayée la valeur antigénétique d'une substance peut également intervenir comme facteur de variation de l'essai.

Certains auteurs [V. Behring ⁽¹⁷⁾ (1890), Brooks ⁽³⁵⁾ (1906), Miss Chick ⁽⁴⁸⁾ (1908), Croner ⁽⁶¹⁾ (1911)] observèrent que l'influence de la température se faisait sentir d'une façon inverse pour l'action antigénétique et pour l'action antibiotique. Ainsi, Miss Chick, étudiant l'action antigénétique d'une solution diluée de phénol sur le bacille paratyphique, observa que la vitesse de désinfection était environ 1,5 à 3 fois plus grande à 20° C. qu'à 30° C. Elle pensa, ce qui nous paraît également logique, que cette influence particulière provenait de ce que les températures considérées étaient plus ou moins proches de la température optima de croissance de l'organisme considéré.

Il importe, évidemment, que l'essai antigénétique soit effectué à la température optima, même, de multiplication des germes en expérience. Mais il faut également tenir compte d'un autre facteur : la volatilité de certains produits antiseptiques à 37° C. Aussi, pour concilier ces deux conditions nécessaires, avons-nous dû opérer de la façon suivante : Les tubes servant à l'essai étaient soigneusement capuchonnés au caoutchouc; puis, après une quinzaine de jours de contact à la température ambiante, les tubes étaient portés à l'étuve à 37°, où ils étaient laissés au moins 48 heures.

Ainsi espérons-nous avoir satisfait non seulement aux conditions nécessaires de stabilité de la solution antiseptique, et aux conditions tout aussi nécessaires, de température optima, mais encore à l'obligation que nous avons de ne tirer nos conclusions sur le développement ou le non-développement des germes qu'après un temps d'observation très prolongé. Il ne faut pas oublier, en effet, que les germes placés, par la présence de l'antiseptique, dans des conditions défavorables, sont loin de pouvoir se développer aussi rapidement que s'ils se trouvaient dans les conditions normales.

C. — INFLUENCE DU POUVOIR ANTIGÉNÉTIQUE SUR LA DÉTERMINATION DU POUVOIR ANTIBIOTIQUE

Nous avons déjà mentionné que la détermination du pouvoir antibiotique par la méthode des suspensions, qui, par ailleurs, représente le procédé de choix, conserve cependant un point défectueux : l'impossibilité d'éviter le transport dans les subcultures, en même temps que les germes, d'une partie du désinfectant à l'essai.

Rappelons que, dans cet essai antibiotique, les dilutions antiseptiques et la suspension microbienne sont laissées en contact pendant un temps donné, puis qu'un échantillon est prélevé dans le mélange et ensemencé dans un milieu de subculture, afin d'y observer le développement des germes non détruits par le désinfectant. Le milieu de subculture contient donc, inévitablement, non seulement les germes qu'on veut y introduire, mais aussi une petite quantité du désinfectant essayé. On conçoit facilement que cette quantité de désinfectant entraîné, si petite soit-elle, puisse exercer, parfois, dans le milieu neuf, une action antigénétique susceptible de fausser les résultats.

Ce fait évident a d'ailleurs été constaté par les premiers auteurs qui ont utilisé ces méthodes des suspensions : V. Esmarch ⁽⁹⁴⁾ (1887), V. Grüber ⁽¹¹⁹⁾ (1891), Geppert ⁽¹¹³⁾ (1891), Heider ⁽¹³²⁾ (1892), Schaeffer ⁽²⁶²⁾ (1894). Cette constatation fut même, comme nous l'avons vu, à l'origine de la mise au point des techniques des « porte-germes », avec lesquelles il devenait facile d'éliminer le désinfectant en excès, en lavant les porte-germes, soit avec de l'eau, soit avec une solution d'un corps chimique neutralisant approprié, avant de les introduire dans les milieux de subculture. Cependant, ayant reconnu les inconvénients des méthodes des porte-germes, on revint ensuite aux méthodes des suspensions.

Mais, fait curieux, il ne semble pas que les divers auteurs et même ceux qui ont réussi à établir des méthodes officiellement admises se soient spécialement préoccupés de la question. Et les quelques auteurs qui envisagèrent ce rôle nuisible de l'influence antigénétique se crurent, vraiment, à peu de frais, à l'abri des erreurs. Ainsi, à notre grand étonnement, dans la publication originale de Rideal et Walker, faite en 1903, dans *The Journal of Sanitary Institute*, nous n'avons trouvé aucune considération de ce problème. Quant aux auteurs qui, plus prudents, envisagèrent la possibilité d'une erreur, ils proposèrent de tourner la difficulté par de simples procédés techniques, sans se rendre compte, même approximativement, de la cause d'erreur dont ils connaissaient l'existence.

Les uns, comme le Dr Klein ⁽¹⁵⁸⁾, dont nous trouvons une lettre à la suite de la publication originale de Rideal et Walker, comme G. Leonard ⁽¹⁷⁷⁾, proposèrent d'utiliser pour les subcultures, au lieu des tubes de bouillon de 5 centimètres cubes, des tubes de 10 centimètres cubes et même plus.

V. Grüber (1891), au VII^e Congrès d'hygiène internationale, et, plus récemment, Scott et Hill (²⁷⁴) (1925), proposèrent, de leur côté, de tourner la difficulté en effectuant, à partir de la première subculture, un nouveau repiquage dans un deuxième milieu, pensant ainsi diluer suffisamment la quantité d'antiseptique transportée pour qu'elle ne soit plus nuisible.

M. Portier (²²⁹), en 1915, étudiant la résistance particulièrement grande aux antiseptiques de certains bacilles voisins du *Bacillus subtilis*, opérait de la façon suivante : les voiles développés sur cultures en bouillon étaient partagés en fragments que l'on immergeait dans les liquides antiseptiques essayés. Après les y avoir laissés le temps voulu, on rejetait le liquide antiseptique et le remplaçait, suivant les cas, par de l'eau distillée stérile, ou par de l'alcool à 95°. On renouvelait ces lavages jusqu'à élimination totale du liquide antiseptique qui imprégnait les cultures. Les fragments de voile ainsi traités étaient ensuite transportés dans le milieu de subculture. C'est là un procédé fort pratique dans le cas de bacilles tels que ceux étudiés par l'auteur ; mais il ne peut malheureusement pas être appliqué au traitement de germes qui se développent sans donner de voiles, et qui se remettent trop facilement en suspension dans les milieux liquides.

D'autres auteurs [V. Esmarch, 1887, et récemment Birkaug (²⁴) (1930)], pour discerner si l'absence de poussée dans les subcultures était due à la destruction antérieure des germes repiqués, ou à l'antiseptique entraîné dans le milieu, proposèrent d'ensemencer dans ce milieu des germes neufs, non traités par le désinfectant.

D'autres encore, à la suite des essais effectués pour les techniques des porte-germes, proposèrent d'ajouter, dans le milieu même de l'essai, après l'action antiseptique, une substance capable de neutraliser chimiquement la substance en expérience [Geppert (¹¹³) (1891), Heider (¹³²) (1892), Bellei (¹⁸) (1903), Schneider et Seligmann (²⁶⁸) (1908)]. C'est ainsi que Geppert, dans les essais avec le sublimé, préconisait l'addition de sulfures, que Bellei utilisait l'ammoniaque pour neutraliser le phénol en excès.

Schneider et Seligmann établirent même les diverses conditions que devait remplir un neutralisant pour être utilisable, à savoir : n'avoir, par lui-même ou par réaction secondaire, aucune propriété inhibitrice, être ajouté en excès, et agir immédiatement après son introduction dans le milieu. Ils proposèrent encore l'utilisation de tubes spéciaux, présentant latéralement, dans leur partie supérieure, une petite excavation destinée à contenir la substance chimique neutralisante, ce qui permettait d'introduire cette substance dans le milieu d'essai, aussitôt après l'action antiseptique, par simple inclinaison du tube. Schneider et Seligmann neutralisaient ainsi l'action antigénétique des désinfectants phénoliques ou crésolés, par la potasse ou la soude, mais ils ne purent trouver, pour certains autres corps, comme le formol, un neutralisant réalisant les conditions requises.

D'autres, enfin, crurent pouvoir apprécier suffisamment le degré de la cause d'erreur commise, soit en estimant vaguement la quantité d'antiseptique transportée dans les subcultures [Churchmann (⁵²) (1920), Shippen (²⁷⁸) (1928)], soit en considérant les valeurs antigéné-

tiques des substances en question. Ainsi, les auteurs anglo-saxons qui utilisaient les méthodes du coefficient phénol avaient cru pouvoir négliger la cause d'erreur en question, du simple fait que le phénol, et les corps voisins qu'ils lui comparaient, possédaient des propriétés antigénétiques peu marquées.

Nous allons examiner maintenant ce que nous pouvons penser de ces différents essais :

a) Le procédé qui consiste à ensemencer les germes prélevés dans une grande quantité de bouillon nutritif est assez logique, puisqu'il permet la dilution de l'antiseptique entraîné sans diminuer le nombre des germes réensemencés. Mais pour qu'il soit réellement opérant, il faudrait agir sur des quantités vraiment grandes de bouillon de subculture, ce qui entraînerait une complexité et une difficulté pratiques, non négligeables pour des essais qui doivent être effectués en série ;

b) Le procédé qui consiste à effectuer, à partir de la première subculture, une deuxième subculture, doit être rejeté, car, s'il réussit peut-être théoriquement à rendre inopérant l'antiseptique entraîné, il réussit certainement à rendre le nombre des germes soumis à l'expérience extrêmement faible et sans aucun rapport avec le nombre des germes soumis à l'action antiseptique. Nous avons vu ci-dessus qu'il était nécessaire de faire agir l'antiseptique sur un grand nombre de germes, pour être sûr d'agir sur quelques-uns, au moins, des éléments microbiens les plus résistants. Nous sommes, par suite, obligée, comme nous l'avons mis en évidence, de repiquer dans les milieux de subculture, sinon la totalité des germes, tout au moins une fraction importante des germes soumis à l'action antiseptique, pour être également sûre d'essayer la survie de quelques-uns de ces germes les plus résistants ;

c) Le procédé qui consiste, pour voir si le milieu de subculture n'est pas inapte au développement microbien, à y réensemencer des germes normaux, ne peut, non plus, être admis : il suffit, en effet, de penser que les germes traités par l'antiseptique, s'ils n'ont pas été tués, sont bien loin de posséder la même force vitale que les bactéries intactes ;

d) Quant aux procédés qui utilisent la neutralisation chimique, nous les avons déjà critiqués au sujet des méthodes des porte-germes. Il est bien évident que l'introduction de substances telles que des bases (soude ou potasse), du sulfhydrate d'ammoniaque, etc..., ne saurait, dans de telles épreuves de toxicité, rester indifférente vis-à-vis des résultats de l'essai ;

e) Les essais de Churchmann et de Shippen nous semblent insuffisants pour deux raisons : Tout d'abord, la quantité transportée par une anse de platine ne représente certainement pas un volume fixe ; cette quantité dépend évidemment de multiples facteurs, densité, viscosité et particulièrement tension superficielle du liquide en question. S'il convient, donc, de mesurer la quantité d'antiseptique transportée, il faut renoncer à effectuer cette mesure par des procédés aussi imprécis que gouttes ou anses. Il faut obligatoirement avoir recours à des mesures exactes de volumes (centimètres cubes ou fractions).

Par ailleurs, la simple connaissance de la quantité d'antiseptique transportée dans les subcultures ne suffit évidemment pas à faire connaître le degré de la gêne apportée dans les subcultures. Cette quantité transportée doit être comparée à la quantité d'antiseptique capable d'inhiber la multiplication microbienne exactement dans les mêmes conditions. Or, pour que cette comparaison puisse avoir quelque valeur, *les conditions de la subculture doivent, évidemment, être absolument semblables aux conditions de l'essai antigénétique*. C'est ce que nous avons réalisé dans notre première méthode de détermination des pouvoirs antibiotiques :

Pour déterminer les pouvoirs antigénétiques, et pour effectuer l'épreuve de survie dans l'essai antibiotique, nous avons utilisé le même milieu de culture, la même température, la même concentration en germes. Cette dernière condition nous a conduite, comme nous l'avons déjà dit, à repiquer dans les 5 centimètres cubes de bouillon de subculture 1/10 de centimètre cube du mélange antiseptique-germes (volume petit et parfaitement mesurable avec exactitude). Le mélange initial antiseptique-germes contenant par centimètre cube 500 millions de germes, nous avons ainsi, finalement, introduit, dans la subculture, 10 millions de germes par centimètre cube, c'est-à-dire précisément la quantité que nous avons utilisée pour l'essai antigénétique.

Notons, cependant, qu'il subsiste inévitablement, dans cette comparaison, une inconnue : c'est la différence de vitalité qui existe entre les germes traités par l'antiseptique (essai antibiotique) et les germes normaux (essai antigénétique). Il n'en reste pas moins vrai que, si nous trouvons pour les quantités d'antiseptique transportées des valeurs très inférieures (1/100-1/1.000 et plus) à celles de la dose antigénétique, nous pouvons nous croire en droit de conclure que la quantité d'antiseptique transportée dans les subcultures est vraiment trop petite pour y empêcher la multiplication des germes.

Nous verrons en détail au troisième chapitre quel est, pour chaque antiseptique étudié, le rapport des deux valeurs que nous avons cherché à comparer. Nous pouvons dire tout de suite que la dose transportée est, pour les halogènes, de l'ordre du 1/1.000 de la dose antigénétique, pour le bichlorure de mercure, de l'ordre du 1/100. Pour ces deux sortes de corps, nous pouvons donc admettre, sans risque de nous tromper, que la dose transportée dans les subcultures est trop petite pour être gênante. Pour les corps phénoliques, au contraire, la quantité transportée n'est plus que de l'ordre du 1/10 de la dose antigénétique ; dans ce cas, nous ne nous croyons donc plus suffisamment à l'abri de la cause d'erreur envisagée. Nous insisterons davantage sur ce point dans le chapitre suivant ; mais, remarquons tout de suite que nous sommes, à ce sujet, en complète opposition avec les auteurs anglo-saxons, lesquels, en utilisant les méthodes du coefficient phénol, n'avaient même pas envisagé la possibilité d'une erreur. Ils considéraient les corps phénoliques comme trop peu antigénétiques pour pouvoir être gênants dans les subcultures ; mais ils avaient simplement oublié que ces corps phénoliques étaient, relativement, encore moins antibiotiques qu'antigénétiques, et que, de ce fait, les concentrations phénoliques qu'il fallait utiliser dans l'essai antibiotique étaient telles que l'on transportait inévitablement dans

les subcultures une quantité de ces corps relativement importante et voisine de la dose antigénétique.

Quoi qu'il en soit, notre première technique de mesure de l'action antibiotique, si elle nous donne des résultats tout à fait valables, comme nous le montrerons encore ci-dessous, pour certains groupes de substances désinfectantes, ne nous donne plus entière satisfaction pour certains autres groupes de substances. C'est pourquoi nous avons cherché, non plus seulement à *évaluer le degré de l'erreur possible*, mais à *éliminer complètement l'erreur en cause*. Dans ce but, une seule technique nous a semblé possible : après action de l'antiseptique, séparer complètement les germes du milieu intermédiaire, puis, avant de les ensemençer dans les milieux de subculture, enlever par des lavages suffisants, à l'eau distillée, la petite quantité d'antiseptique qu'ils peuvent entraîner encore avec eux.

Ceci nous a nécessairement conduit à une technique de centrifugation. Notons que, il y a fort longtemps, certains auteurs avaient déjà songé à utiliser ce procédé : dès 1894, Schaeffer, utilisant la méthode des suspensions, séparait par centrifugation les spores du bacille du charbon, traitées par HgCl_2 , avant de les subcultiver en bouillon.

L'on peut également considérer comme un ancêtre de la centrifugation Defries ⁽⁷¹⁾ (1898), qui opérait sur des germes desséchés en une mince pellicule au fond de tubes à essais. Zikes ⁽³¹³⁾ (1902), Bellei ⁽¹⁸⁾ (1903), et enfin Dithorn et Bartel ⁽⁷⁹⁾ (1923) proposèrent de véritables techniques de centrifugation. Mais l'emploi d'appareils spéciaux ou de corps inertes destinés à entraîner les germes, préconisé par ces divers auteurs, nous semble introduire dans l'essai de nouveaux facteurs d'incertitude ou de complexité.

Pour notre part, sur les conseils de M. le professeur Radais, nous avons donc eu recours à une technique de centrifugation ; mais nous avons cherché à utiliser la simple centrifugation, réalisable par tous, avec les modèles de centrifugeuses couramment employés dans les laboratoires. Pour l'établissement de cette deuxième technique, nous avons, comme dans l'établissement de la première, tiré profit des données, expérimentalement acquises, que nous avons exposées dans notre deuxième chapitre. Nous exposerons, dans notre troisième chapitre, cette deuxième technique d'essai des pouvoirs antibiotiques, basée sur une technique de centrifugation.

En résumé, nous disposons de deux moyens pour éviter l'erreur apportée aux résultats de l'essai antibiotique par les propriétés antigénétiques du désinfectant entraîné dans les subcultures :

1^o Nous pouvons utiliser notre technique des suspensions, directement, telle que nous en avons établi les conditions, et *évaluer quantitativement l'erreur possible*, en comparant à la dose antigénétique de la substance essayée la quantité transportée dans les subcultures ;

2^o Nous pouvons *éliminer complètement l'antiseptique* en excès, avant d'effectuer les subcultures, par centrifugation et lavage des germes à l'eau stérile, procédé d'élimination qui nous semble être le moins discutable. Nous verrons plus loin dans quels cas il convient d'utiliser l'une ou l'autre de ces techniques, et quels sont leurs avantages réciproques.

CHAPITRE III

EXPOSÉ DES MÉTHODES PROPOSÉES

Au cours de notre *premier chapitre*, nous avons examiné les principales méthodes proposées pour l'essai, *in vitro*, des substances chimiques antimicrobiennes ; nous avons reconnu la supériorité des techniques basées sur l'emploi des suspensions microbiennes, et ne comportant pas de détermination relative par rapport à un désinfectant type pris comme étalon.

Ayant, par ailleurs, constaté qu'aucune des méthodes décrites n'était exempte de critiques graves, nous avons attribué ce fait à l'insuffisante précision apportée à l'étude préliminaire des conditions de l'essai du pouvoir antimicrobien. Nous avons donc jugé indispensable, pour élaborer des méthodes d'essai offrant le maximum de garanties, de reprendre, point par point, l'étude des divers facteurs en jeu. Au cours de notre *deuxième chapitre*, à l'aide des travaux antérieurs aux nôtres et de nos propres essais, nous avons donc montré l'influence exercée par chacun de ces facteurs sur la valeur des résultats, puis nous avons fixé, successivement, les valeurs qu'il convenait d'attribuer à ces facteurs dans les méthodes de mesure des pouvoirs antimicrobien, antigénétique et antibiotique.

Dans ce *deuxième chapitre*, nous avons également montré comment il fallait chercher d'abord à connaître, puis à éliminer, la cause d'erreur qui réside dans le transport d'une petite quantité d'antiseptique dans les milieux de subculture, en même temps que les germes.

Dans le *troisième chapitre*, il ne nous reste donc plus qu'à exposer des techniques que nos essais précédents ont contribué à établir, et à donner les résultats que ces techniques nous ont permis d'obtenir.

Nous exposerons donc d'abord :

Les techniques générales communes aux trois méthodes de mesure de l'activité antimicrobienne que nous utiliserons. Nous examinerons ainsi successivement :

1^o La *préparation des solutions désinfectantes* destinées aux essais ;

2^o La *préparation des germes pour les essais*. La *préparation des suspensions microbiennes*, la *numération des germes* qu'elles contiennent et la réalisation des suspensions titrées nécessaires aux essais ;

3^o La *préparation des milieux de culture et de subculture* ;

4^o La *préparation des milieux où se fait le contact de l'antiseptique et des germes*, au cours des essais de pouvoir antibiotique ;

5^o L'*évaluation des résultats* de l'essai.

Nous passerons ensuite à la description des techniques utilisées. Nous examinerons :

1^o La *méthode de détermination du pouvoir antigénétique d'une substance* :

a) Exposé de la technique ; b) exemples détaillés ; c) exposé général des résultats.

2^o La *méthode de détermination du pouvoir antibiotique, avec évaluation de la validité de l'essai* (« technique directe ») :

a) Exposé de la technique ; b) exemples détaillés ; c) exposé général des résultats : discussion de la régularité des résultats ; discussion de la validité des résultats.

3^o La *méthode de détermination du pouvoir antibiotique, par centrifugation, avec élimination totale du désinfectant* avant d'effectuer les subcultures :

a) Exposé de la technique ; b) exemples détaillés ; c) exposé général des résultats : discussion de la régularité de ces résultats.

Nous terminerons enfin ce troisième chapitre en montrant dans quels cas la *méthode directe* de mesure du pouvoir antibiotique, plus régulière, plus rapide, est suffisante, et dans quel cas il convient d'utiliser la *méthode par centrifugation*, applicable à tous les corps, mais plus difficile à réaliser, plus longue, et donnant des résultats peut-être moins réguliers.

I. — TECHNIQUES GÉNÉRALES COMMUNES A NOS MÉTHODES DE MESURE DE L'ACTIVITÉ ANTIMICROBIENNE

1^o *Préparation des solutions désinfectantes destinées aux essais.*

Les solutions désinfectantes sont préparées, au moment même de l'essai, en pesant, à la balance de précision, une quantité donnée du produit, que l'on dissout dans de l'eau distillée stérile de pH voisin de 6,0. On complète dans des flacons jaugés, au nombre de centimètres cubes voulu. Les solutions ainsi obtenues sont parfois, pour plus de sécurité, titrées immédiatement avant l'essai, lorsqu'il s'agit, par exemple, de substances volatiles, ou de solutions capables de baisser rapidement de titre (eau de chlore, hypochlorites alcalins).

Les quantités de solutions désinfectantes à utiliser pour les essais sont mesurées à l'aide de pipettes stérilisées graduées au 1/100 de centimètre cube.

2^o *Préparation des germes pour l'essai. Préparation des suspensions microbiennes et numération des germes qu'elles contiennent. Réalisation des suspensions titrées nécessaires aux essais.*

a. Préparation des germes pour l'essai. — Les organismes microbiens utilisés pour l'essai sont préparés de la manière suivante :

Les souches de staphylocoque, de colibacille, et, au besoin, de bacilles typhique ou paratyphique, sont conservées en bouillon gélatiné. Chaque mois, un de ces tubes est placé à l'étuve à 37°, pendant 24 heures, puis une anse de la culture est repiquée dans un autre tube de gélatine liquéfiée. Après un séjour de 24 heures à 37°, cette nouvelle culture est conservée au frais.

A partir du troisième jour précédant l'essai, la souche est repiquée journellement sur bouillon gélosé incliné, et placée chaque fois 24 heures à l'étuve à 37°. La dernière de ces trois cultures est utilisée pour la préparation de la suspension microbienne nécessaire à l'essai.

Les cultures de bacille diphtérique nécessaires à l'essai sont préparées de la même façon. Seuls les milieux de culture sont différents : la conservation des souches est faite en bouillon additionné de liquide d'ascite, et les cultures destinées à la préparation des suspensions sont faites sur bouillon gélosé additionné de liquide d'ascite.

Les souches de *Bacillus subtilis* sont conservées, également, dans un endroit frais, sur bouillon gélosé, et repiquées tous les mois sur ce milieu. Les cultures destinées à la préparation des suspensions sont préparées sur plaques de gélose, en boîtes de Pétri, 5 jours avant l'essai et placées à l'étuve à 37°, afin d'assurer la sporulation des germes.

Rappelons qu'un essai préliminaire a été effectué, afin de s'assurer de la résistance suffisante des souches en expérience.

b) Préparation de la suspension microbienne. — La suspension microbienne est donc préparée à partir des cultures, effectuées à 37°, sur gélose, âgées de 24 heures pour les formes végétatives, et de 5 jours pour les formes sporulées. Elle est effectuée, en principe, dans de l'eau distillée de pH voisin de 6,0, dans la majorité des cas. Le liquide de suspension est préalablement stérilisé dans une fiole d'Erlenmeyer en verre Pyrex, d'une contenance de 250 centimètres cubes, dans laquelle se trouvent également des billes de verre lisse, en quantité suffisante pour recouvrir le fond de la fiole.

Le prélèvement et l'émulsion des germes sont effectués très soigneusement, afin d'éviter l'entraînement de masses microbiennes agglomérées ou de particules de gélose, ce qui nécessiterait une filtration ultérieure de la suspension. Avec toutes les précautions bactériologiques d'usage, les germes sont prélevés avec l'anse de platine, sur la surface de la gélose, en évitant de gratter celle-ci, puis ils sont émulsionnés, sur la paroi interne de la fiole, dans une goutte du liquide que l'on dilue graduellement dans le reste du liquide d'émulsion. L'agitation ultérieure de la fiole, d'un mouvement circulaire, permet, grâce à la présence des billes de verre, d'assurer une répartition homogène des germes qui auraient échappé à la dispersion.

On obtient ainsi une suspension microbienne parfaitement homogène, dans laquelle on peut procéder à la numération des germes, sur un échantillon prélevé à la pipette. Durant cette numération, la fiole contenant la suspension est placée à la glacière, afin d'empêcher ou de retarder au maximum la prolifération des germes durant le temps nécessaire à la numération.

c) Numération des germes de la suspension microbienne. — De nombreuses méthodes ont été proposées pour évaluer le nombre de bactéries contenues dans un volume déterminé d'une suspension bactérienne. On peut les classer en deux groupes :

1° Les méthodes basées sur des mesures physiques :

- a) Déterminant le volume ou le poids de la masse bactérienne isolée par centrifugation ;
- b) Évaluant la quantité de matière colorante absorbée par la suspension ,
- c) Appréciant le degré d'opacité de l'émulsion.

2° Des techniques bactériologiques :

- a) Techniques de numération microscopique ;
- b) Ensemencement sur milieux solides ou liquides et numération des colonies développées.

Toutes ces méthodes ne sont pas également utilisables pour le but que nous poursuivons ici : préparer, aussi rapidement que possible, avec précision, une suspension de concentration déterminée en germes, sur laquelle nous ferons agir les désinfectants à étudier. Il ne pouvait pas être question pour nous d'utiliser, par exemple, des techniques qui ne peuvent donner que des renseignements tardifs (techniques bactériologiques d'ensemencement).

Parmi les méthodes basées sur des mesures physiques, seule la méthode opacimétrique nous semble susceptible d'être utilisée; à la condition, toutefois, que l'on prépare des échelles comparatives pour chaque germe en expérience, la méthode opacimétrique nous semble donner une idée assez exacte de la masse bactérienne présente. De plus, cette méthode est d'exécution rapide. Elle oblige cependant, pour atteindre une précision suffisante, à utiliser des appareils dont le prix peut être fort coûteux.

Comme il s'agit, dans le présent travail, d'une mise au point, nous avons tenu à mettre de notre côté le maximum de chances, en recherchant la précision maxima. C'est pourquoi nous avons tenu à utiliser une technique de numération microscopique.

Parmi les techniques de numération microscopique, deux techniques nous semblaient spécialement adaptées à notre but :

1^o La numération des germes à la cellule compte-microbes ;

2^o La méthode de numération microscopique indirecte ou comparative utilisée par Wright pour titrer les vaccins microbiens.

Des essais effectués près de nous au laboratoire de M. J. Régner, et qui seront publiés ultérieurement, nous ont montré que la première de ces techniques, tout au moins avec les appareils que l'on peut se procurer en France, ne présentait pas une supériorité nette. Nous nous sommes donc finalement ralliée à la deuxième, dont nous avons, du reste, déjà l'habitude.

En effet, dans un travail entrepris en 1927, en collaboration avec M. J. Régner, afin de suivre la multiplication normale du bacille pyocyane dans un milieu de culture liquide, nous avons utilisé d'abord la technique de Wright, puis une modification de cette technique. La technique de Wright est, rappelons-le, la suivante :

On mélange un volume (0^{cc},5) de sang de lapin, prélevé à la veine marginale de l'oreille, à un volume de solution de citrate de soude à 1,5 p. 100, et on y ajoute un volume de suspension microbienne pure ou diluée (selon la quantité probable de germes par unité de volume). Après mélange convenable, on fait à l'anse de platine quelques étalements sur lames et on sèche rapidement par agitation à l'air. Les préparations peuvent être colorées par la méthode de Tribondeau.

Les microbes apparaissent, au microscope, colorés en bleu violacé et les hématies en rouge. On peut ainsi, à l'aide d'un oculaire quadrillé, compter facilement les deux sortes d'éléments, et établir leur rapport. Le nombre d'hématies, par centimètre cube de sang, ayant été préalablement déterminé à l'hématimètre, on obtient, par un calcul simple, la quantité de germes par centimètre cube de suspension bactérienne.

Mais nous avons rencontré de grandes difficultés dans la mise au point de cette technique :

a) Les prises de sang au lapin ne fournissaient que des quantités de sang restreintes et il fallait prendre de multiples précautions pour éviter la coagulation du sang prélevé ;

b) Il fallait une très grande habitude pour obtenir des étalements réguliers, où bactéries et hématies fussent bien étalées et réparties d'une manière homogène ;

c) La coloration n'était pas toujours satisfaisante, soit que les hématies fussent plus ou moins hémolysées, soit que des précipités de colorant vinssent gêner la numération ;

d) Enfin, le procédé n'était pas suffisamment rapide : il fallait compter au moins un quart d'heure pour le prélèvement du sang, 5 minutes pour l'étalement et la dessiccation et 25 minutes pour la coloration et le lavage des préparations. En comptant une heure pour la numération des quatre lames préparées, cela faisait au total, au minimum, une heure trois quarts pour l'essai.

Devant ces difficultés, nous avons renoncé à utiliser les hématies comme éléments de comparaison, et nous avons cherché à les remplacer par des éléments figurés de taille analogue, plus faciles à obtenir et à colorer. Sur les conseils de M. J. Régnier, nous nous sommes arrêtée aux cellules de levure des boulangers, comme l'avait déjà préconisé Fries. L'utilisation de ce procédé nous a donné beaucoup moins de peine, les résultats ont été obtenus beaucoup plus rapidement, et ils se sont même montrés plus réguliers.

Le procédé finalement adopté et utilisé dans les essais que nous présentons ici consiste donc, en principe, à mélanger un certain volume de suspension titrée de levure à un volume également connu de suspension microbienne, à étaler, sur plusieurs lames, une goutte de ce mélange, à colorer, et à compter, sur chaque lame, la proportion relative des deux éléments.

Dans nos premiers essais, conservant notre méthode de coloration primitive, nous utilisions la technique de Tribondeau. Mais il se produisait parfois des précipités de colorant très gênants, malgré l'emploi, pour les colorations et pour les lavages, d'eau bi- ou tridistillée absolument neutre. Cherchant alors à utiliser une méthode de coloration simple, nous nous sommes arrêtée, après plusieurs essais, à l'emploi de la fuchsine phéniquée diluée, après fixation par le mélange alcool-éther.

TECHNIQUE UTILISÉE POUR LA NUMÉRATION DES GERMES

La technique que nous avons finalement utilisée comprend différents points que nous allons décrire successivement en détails :

- α) Préparation et numération de l'émulsion de levure ;
- β) Préparation du mélange : suspension bactérienne et suspension de levure ; coloration du mélange ;
- γ) Numération des éléments et calcul des résultats.

α) PRÉPARATION ET NUMÉRATION DE L'ÉMULSION DE LEVURE. — Disposant de quelques grammes de levure des boulangers aussi fraîche que possible, on prélève, au centre de la masse, un petit fragment d'un gramme environ, que l'on délaye soigneusement dans un mortier de verre avec quelques gouttes d'eau distillée stérile, de façon à obtenir une pâte lisse aussi homogène que possible. Puis l'on délaye peu à peu cette pâte dans 60 centimètres cubes d'eau distillée stérile ajoutée par portion de 5 centimètres cubes, en décantant chaque fois, après quelques secondes de repos, la portion surnageante, que l'on verse dans une fiole d'Erlenmeyer stérile garnie de billes de verre. On ajoute 1 centimètre cube de chloroforme à cette émulsion, pour en assurer la conservation. L'émulsion de levure étant bien agitée, on en prélève à la pipette stérile 1 centimètre cube que l'on dilue à 50 centimètres cubes dans une fiole jaugée ; 1 goutte de cette dilution est placée, pour la numération des éléments de la levure, dans la cellule de l'hématimètre de Malassez (objectif n° 8, oculaire n° 6).

Après avoir attendu que les cellules de levure se soient bien déposées sur la partie inférieure de la goutte, on procède à la numération de ces cellules dans 6 ou 7 rectangles du quadrillage de l'hématimètre, rectangles pris au hasard, en des points éloignés les uns des autres. Chacun de ces rectangles, divisé en 20 petits carrés, correspond à 1/100 de millimètre cube.

Voici, à titre d'exemple, les résultats d'une numération selon cette technique :

1 ^{er} rectangle :	2	4	1	0	2
48	4	1	4	2	4
	3	1	2	3	2
	1	6	1	2	3
	10	12	8	7	11

2 ^e rectangle :	2	4	3	2	2
58	1	3	1	5	3
	6	4	1	4	1
	2	5	3	3	2
	11	16	9	14	8

3 ^e rectangle :	4	2	2	2	1
42	1	3	4	1	3
	2	1	4	1	2
	3	1	1	2	2
	10	7	11	6	8

4 ^e rectangle :	48.
5 ^e rectangle :	60.
6 ^e rectangle :	34.
7 ^e rectangle :	50.

La moyenne de ces numérations nous donne, par rectangle :

$$48-58-42-48-60-34-50 = \frac{340}{7} = 48,5.$$

Or, chacun de ces rectangles représente 1/100 de millimètre cube. Un centimètre cube de notre dilution de levure (au 1/50) contient donc : $48,5 \times 100 \times 1.000 = 4.850.000$ cellules de levure, ce qui fait, par centimètre cube de l'émulsion mère : $4.850.000 \times 50 = 242.500.000$ cellules de levure.

Il est prudent, lorsqu'on n'a pas une grande habitude de la technique, de procéder à deux numérations, à quelques heures d'intervalle, par exemple, et de prendre comme résultat la moyenne des deux valeurs obtenues.

La suspension de levure se conserve bien à la glacière en présence de

chloroforme. Il suffit de la renouveler tous les dix jours environ, à moins qu'il n'y apparaisse des germes de contamination qui généraient ultérieurement la numération des germes étudiés. On est d'ailleurs facilement averti du vieillissement de la levure par la difficulté qu'elle acquiert à se colorer.

La suspension de levure ayant été préparée à l'avance, il suffit, au moment de l'essai, de bien agiter la fiole qui la contient, avant de procéder au mélange avec les éléments microbiens.

β)' PRÉPARATION ET COLORATION DU MÉLANGE (suspension de levure-émulsion microbienne). — Dans un tube à essai stérile contenant des billes de verre, on introduit une quantité connue (2 centimètres cubes) de l'émulsion de levure de titre connu (environ 200 à 250 millions par centimètre cube). On y ajoute une quantité déterminée (0^{cc},2) de suspension microbienne et on agite vivement le mélange pour y assurer une répartition homogène des éléments en suspension. Rapidement, sans laisser aux bactéries et aux cellules de levure le temps de se déposer, et en continuant à agiter le mélange, on y prélève au moyen d'une pipette Pasteur stérile, pas trop effilée, 1 goutte que l'on dépose sur une lame bien dégraissée (1) et rigoureusement propre. Aussitôt déposée sur la lame, cette goutte est étalée à l'aide d'une pipette Pasteur fermée à son extrémité. Trois autres lames sont ainsi préparées. On laisse alors sécher les étalements, sans chauffer les lames, on fixe les préparations à l'alcool-éther, puis on colore pendant 5 minutes avec une dilution aqueuse à 10 p. 100 de fuchsine de Ziehl. On lave ensuite soigneusement les lames à l'eau distillée, en laissant couler doucement l'eau sur l'extrémité supérieure de la lame inclinée.

Les lames ainsi préparées doivent être nettes, les cellules de levure et les bactéries se détachant bien les unes des autres, et la proportion, par champ, des deux sortes d'éléments n'étant pas trop abondante. Il est évident que, seule, l'habitude peut indiquer les dilutions des deux suspensions à employer, et leur rapport. Il est également évident que ces valeurs dépendent des concentrations microbiennes à obtenir.

γ) NUMÉRATION DES ÉLÉMENTS SUR LES LAMES COLORÉES ET CALCUL DES RÉSULTATS. — La numération des éléments est effectuée en comptant soigneusement le nombre de cellules de levure et le nombre de bactéries, dans une quinzaine de champs, pris au hasard, sur chacune des trois meilleures lames, en parcourant l'étalement dans toute sa largeur. La moyenne des nombres obtenus pour ces trois lames est prise comme résultat. Nous donnons ci-dessous un exemple choisi parmi nos essais, et destiné à montrer que, si l'on opère soigneusement, on obtient, pour chaque goutte étalée, un nombre d'éléments assez régulier.

Ces nombres donnent comme somme des cellules de levure : 635 et comme somme des bactéries : 1.386.

(1) Les lames sont dégraissées par séjour prolongé dans l'alcool ammoniacal.

1 ^{re} lame.		2 ^e lame.		3 ^e lame.	
Cellules de levure.	Staphylocoques.	Cellules de levure.	Staphylocoques.	Cellules de levure.	Staphylocoques.
11	23	14	42	6	17
19	34	13	15	10	32
25	55	11	18	15	28
18	47	9	22	12	22
10	36	8	43	19	37
14	65	10	21	12	25
24	38	19	28	13	40
36	74	16	53	9	21
20	68	12	24	11	29
12	36	14	45	25	48
7	21	10	28	17	24
10	17	16	8	21	40
12	20	5	16	9	12
22	25	9	11	24	35
8	15	6	5	12	23
248	574	172	379	215	433

soit, pour la 1^{re} lame, une proportion de $\frac{1}{2,3}$, pour la 2^e, de $\frac{1}{2,1}$, pour la 3^e, de $\frac{1}{2}$.

Connaissant le titre de la suspension de levure (ici 231 millions) et le rapport des éléments levures et bactéries dans le mélange (635 et 1.386), mélange constitué par 2 centimètres cubes de suspension de levure pour 0^{cc},2 de suspension bactérienne, il est facile de déterminer le titre de l'émulsion bactérienne :

$$\frac{2}{0,2} \times \frac{1386}{635} \times 231 = 5.042 \text{ millions de staphylocoques par centimètre cube d'émulsion,}$$

ce qui est une application de la formule générale :

$$X = \frac{\text{volume de levures}}{\text{volume de bactéries}} \times \frac{\text{somme bactéries}}{\text{somme levures}} \times K,$$

où X est le titre de la suspension microbienne en millions par centimètre cube,
K — — — — — de levures — — — — —

La numération peut ainsi être effectuée en une heure au maximum.

Il ne reste plus alors qu'à calculer la quantité de la suspension microbienne qu'il convient d'utiliser pour avoir la concentration en germes nécessaire à l'essai.

3^o Préparation des milieux de culture.

Les milieux de culture et de subculture, utilisés au cours des essais, devant être de composition absolument constante, nous les avons préparés nous-même.

a) **BOUILLON PEPTONÉ SALÉ A DOUBLE CONCENTRATION.** — Ce milieu est destiné à l'essai du pouvoir antigénétique. Comme il doit être mélangé à la solution désinfectante et à l'émulsion microbienne, il est préparé à double concentration, afin de pouvoir être finalement ramené à la concentration normale, avec de l'eau distillée, après addition de la dilution antiseptique et des germes. Sa *composition* est la suivante :

Viande de bœuf dégraissée, hachée.....	1.000	grammes.
Peptone de Witte	40	—
Chlorure de sodium	10	—
Eau distillée.	1.000	—

Préparation. — La viande fraîche, aussitôt hachée, est mise à macérer dans l'eau froide, dans une capsule de porcelaine, et abandonnée ainsi à la température du laboratoire pendant 24 heures. On agite de temps en temps. Le lendemain, la viande est exprimée dans un linge fin, ce qui fournit un liquide rougeâtre que l'on réunit au liquide resté dans la capsule. Le tout est porté à l'ébullition dans un récipient émaillé. L'ébullition est maintenue 2 à 3 minutes, en agitant continuellement, afin de coaguler les albumines. On filtre ensuite le liquide sur un papier filtre mouillé, afin d'éliminer les matières grasses. On obtient ainsi un liquide jaune clair dans lequel on fait dissoudre les quantités pesées de peptone et de chlorure de sodium, en le chauffant de nouveau si besoin. On complète, avec de l'eau distillée, au volume initial (1.000 centimètres cubes). On laisse refroidir ce liquide, puis on en prend le pH, que l'on ajuste à 7,0 à l'aide de lessive de soude pure diluée au 1/5. (Il faut, en général, ajouter 20 à 30 centimètres cubes de cette dilution par litre de bouillon.) Le bouillon ainsi préparé est alors porté à l'autoclave à 120° pendant 15 minutes, pour précipiter les sels terreux. Au sortir de l'autoclave, ce bouillon est filtré sur un filtre ébouillanté, puis réparti en ballons, et stérilisé durant 20 minutes à 115° C.

La viande fraîche de bœuf a été préférée aux extraits Liebig, car elle donne des bouillons généralement plus favorables à la croissance des germes. Certains auteurs ont préconisé ces extraits, de constitution plus constante, à leur avis. Nous ne pensons pas qu'il existe de bien grandes différences de composition entre les divers échantillons de viande fraîche. De plus, pour éviter autant que possible ces variations, nous avons toujours préparé à la fois un stock important de nos milieux, destiné à servir à de nombreux essais.

Avant d'entreprendre nos essais, nous nous sommes toujours assurée, au préalable, que le bouillon préparé permettait une culture abondante des germes soumis à l'essai.

La *peptone* utilisée provenait d'un même stock de peptone de Witte.

L'*eau distillée* était seule utilisée. Il ne pouvait être question d'employer de l'eau ordinaire de la ville de Paris, javellisée, contenant des traces de chlore, fort capables de modifier les résultats des essais.

La *réaction* du milieu a été ajustée à pH 7,0 au moyen de la méthode colorimétrique, en utilisant comme gamme étalon l'échelle de Clark et Lubs, et comme indicateur le bleu de bromothymol.

On a veillé à n'utiliser, pour la préparation de ce milieu de culture,

aucun récipient pouvant lui abandonner quelque substance douée d'une action antiseptique quelconque, ou quelque substance susceptible de modifier l'action de la substance essayée. Nous n'avons donc utilisé que des capsules de porcelaine, des récipients émaillés de bonne qualité et des ballons en verre Pyrex. Ces derniers étaient utilisés pour la conservation des milieux en réserve. Ils étaient capuchonnés au caoutchouc et placés dans un endroit frais. La répartition en tubes se faisait au moment de l'essai.

b) BOUILLON PEPTONÉ SALÉ SIMPLE. — Ce milieu de culture est préparé exactement comme le précédent, mais en employant pour les mêmes quantités de peptone, de chlorure de sodium et de viande, une quantité d'eau deux fois plus grande. Sa *composition* est donc la suivante :

Viande de bœuf dégraissée, hachée	500 grammes.
Peptone de Witte	20 —
Chlorure de sodium	5 —
Eau distillée	1.000 —

Ce milieu sert à effectuer les subcultures des germes, après traitement par le désinfectant, dans la deuxième phase de l'essai antibiotique ; si ce germe est le bacille diphtérique qui pousse mal en bouillon, les subcultures sont effectuées en bouillon additionné de liquide d'ascite :

c) BOUILLON ASCITE. — Ce bouillon est préparé en ajoutant aseptiquement, au moment de l'emploi, à 5 centimètres cubes de bouillon simple, V gouttes de liquide d'ascite conservé en ampoules.

d) BOUILLON GÉLOSÉ. — Le bouillon gélosé sert à l'ensemencement des souches nécessaires à la préparation des émulsions microbiennes.

Sa *préparation* est la suivante :

Vingt grammes de gélose sèche, de bonne qualité, sont mis à macérer dans l'eau pendant une heure environ. La gélose étant suffisamment gonflée, on l'exprime soigneusement, puis on l'introduit dans un ballon de 2 litres contenant 1 litre de bouillon simple peptoné salé. Le tout est chauffé vers 80-85° C. pendant une dizaine de minutes, puis on laisse refroidir légèrement. On vérifie alors le pH qui est, s'il y a lieu, ramené à 7,0. Le récipient, bouché au coton, est alors porté à l'autoclave, et l'on maintient la température à 120° pendant 45 minutes, pour achever de solubiliser la gélose. Au bout de ce temps, et immédiatement au sortir de l'autoclave, le liquide est filtré sur filtre Chardin ébouillanté. Pour activer la filtration et éviter le refroidissement rapide de la gélose, il est prudent d'effectuer la filtration dans l'autoclave ouvert et chauffé. Le liquide filtré est réparti, par 10 centimètres cubes, en tubes à essais que l'on stérilise ensuite pendant 20 minutes à 115° C. Les tubes sont inclinés au sortir de l'autoclave, capuchonnés et conservés dans un endroit frais.

Pour effectuer les cultures de bacille diphtérique, on prépare de la gélose ascite.

e) GÉLOSE ASCITE. — Ce milieu est constitué par le bouillon gélosé,

précédemment décrit, additionné aseptiquement, au moment de l'emploi, de liquide d'ascite, à raison de X gouttes pour 10 centimètres cubes de milieu. Pour la conservation des souches bactériennes, nous utilisons le :

f) **BOUILLON GÉLATINÉ.** — Le bouillon gélatiné est préparé par addition au bouillon peptoné salé simple de 12 p. 100 de gélatine. L'opération est effectuée comme pour le bouillon gélosé, mais les deux stérilisations à l'autoclave sont faites à température légèrement plus basse (115° pour la première et 110° pour la seconde).

En dehors de ces milieux destinés à la culture, à la conservation ou à l'entretien des souches, il nous faut mentionner la préparation du liquide de macération de viande, milieu que nous avons utilisé pour comparer la résistance aux désinfectants de germes plus ou moins âgés.

g) **MACÉRATION DE VIANDE.** — La composition de ce milieu est la suivante :

Viande de bœuf dégraissée, hachée	1.000 grammes.
Eau distillée.....	2.000 —

La préparation est identique à celle du bouillon peptoné salé. Seul le temps de l'addition de la peptone et du chlorure de sodium est supprimé.

4° Préparation des milieux où se fait, dans l'essai du pouvoir antibiotique, le contact de l'antiseptique et des germes.

Il nous faut encore mentionner la préparation des divers milieux dans lesquels nous aurons à déterminer le pouvoir antibiotique.

Nous avons vu, dans le chapitre précédent, que l'essai du pouvoir antibiotique en eau distillée ne suffisait pas à donner une idée de la valeur pratique d'un désinfectant, et que deux sortes de substances étaient particulièrement susceptibles de modifier cette action : *les matières salines* et *les matières albuminoïdes*. Les déterminations des pouvoirs antibiotiques, que nous avons effectuées, ont donc porté sur cinq milieux, que nous appelons *milieux intermédiaires*, et qui représentent les milieux dans lesquels s'effectue le contact, pendant un temps limité, entre la suspension bactérienne et la solution désinfectante.

Ces cinq milieux sont :

a) **L'EAU DISTILLÉE STÉRILE.** — Cette eau est préparée à l'aide d'eau distillée commerciale, redistillée une seconde fois sur acide phosphorique, et une troisième fois sur baryte. Elle présente un *pH* de 6,0 à 6,2. Elle est répartie, à raison de 5 et de 10 centimètres cubes, en tubes à essais rigoureusement propres, et stérilisée à l'autoclave à 120° durant 20 minutes.

b) **L'EAU PHYSIOLOGIQUE STÉRILE** préparée comme suit : De l'eau tridistillée stérile, contenant 8 grammes p. 1.000 de chlorure de sodium

pur, est répartie, à raison de 5 et de 10 centimètres cubes, dans des tubes à essais rigoureusement propres, et stérilisée à l'autoclave à 120°, durant 20 minutes.

c) L'EAU ALBUMINEUSE, préparée en ajoutant à de l'eau physiologique stérile un égal volume de liquide d'ascite, de telle sorte que la teneur finale en albumine soit de 20 grammes p. 1.000. Ce milieu est préparé aseptiquement au moment de l'essai.

d) LA MACÉRATION DE VIANDE, précédemment décrite. Ce milieu a été utilisé pour déterminer des pouvoirs antibiotiques, d'une part, vis-à-vis de germes âgés de 5 heures, et d'autre part vis-à-vis de germes âgés de 24 heures.

e) LE BOUILLON PEPTONÉ SALÉ précédemment décrit. Ce milieu, dans lequel s'effectue habituellement la détermination du pouvoir antigénétique, a été utilisé aussi pour effectuer certains essais antibiotiques, afin de pouvoir comparer directement les résultats de ces deux déterminations.

5° Évaluation des résultats de l'essai.

Il est bien évident que l'on ne peut se contenter d'un seul essai pour obtenir le résultat cherché. Il convient d'effectuer tout d'abord plusieurs *essais préliminaires*, en resserrant chaque fois davantage les doses de substance antiseptique en expérience. On arrivera ainsi, peu à peu, à mettre en œuvre des quantités de la substance antiseptique suffisamment rapprochées pour donner des *résultats définitifs*. On effectuera ensuite plusieurs de ces essais définitifs et on prendra la moyenne de leurs résultats. Pour notre part, nous avons ainsi été amenée à effectuer, dans certains cas, plus d'une quinzaine de ces essais définitifs. On ne saurait évidemment exiger un tel degré de précision d'une technique destinée à des fins pratiques ; le bénéfice d'une grande exactitude serait finalement payé par une dépense exagérée de temps et d'argent. Mais, pour qu'un chiffre puisse avoir une valeur réelle, nous estimons qu'il doit être la moyenne de trois, au moins, de ces essais définitifs.

Cette notion d'essais définitifs nous entraîne à préciser les approximations que nous avons généralement adoptées pour apprécier les résultats :

Lorsque le résultat est de l'ordre du *gramme*, l'approximation adoptée est de l'ordre de 0g,05.

Lorsque le résultat est de l'ordre du *décigramme*, l'approximation adoptée est de l'ordre de 0g,01.

Lorsque le résultat est de l'ordre du *centigramme*, l'approximation adoptée est de l'ordre de 0g,001.

Lorsque le résultat est de l'ordre du *milligramme*, l'approximation adoptée est de l'ordre de 0g,0 001.

En somme, nous avons adopté une approximation du 1/10 de la dose trouvée, sauf dans le cas des doses élevées, où l'approximation atteint 1/20 de cette dose.

II. — DÉTERMINATION DE LA DOSE ANTIGÉNÉTIQUE D'UNE SUBSTANCE CHIMIQUE

Le *pouvoir antigénétique* d'une substance, vis-à-vis d'un microbe donné, est la faculté que possède cette substance de suspendre temporairement la vie de ce germe, ou de s'opposer à son développement, dans un milieu où se trouvent réalisées les conditions optima.

Nous le représentons par la *dose antigénétique*, c'est-à-dire par la dose de cette substance qu'il suffit d'ajouter à un litre de bouillon de culture, pour y empêcher le développement d'une quantité connue (10 millions par centimètre cube) de ces germes, dans des conditions favorables déterminées.

Le pouvoir antigénétique d'une substance, vis-à-vis d'un germe donné, est donc d'autant plus grand que la dose antigénétique de cette substance est elle-même plus petite.

La détermination de la dose antigénétique d'une substance est effectuée de la façon suivante :

La solution de la substance antiseptique et la suspension du germe choisi pour l'essai ayant été préparées comme nous l'avons dit ci-dessus, on calcule, d'une part, les quantités de solutions désinfectantes à mettre en expérience et, d'autre part, la quantité de suspension microbienne à introduire dans le milieu pour y assurer une concentration en germes de 10 millions par centimètre cube. Ces diverses valeurs étant établies, on dispose une série de tubes à essai, contenant chacun 2^{cc},5 de bouillon peptoné salé à concentration double. On y ajoute la quantité de suspension bactérienne suffisante pour apporter, dans chaque tube, 50 millions de germes, puis, aussitôt après, des quantités croissantes de la solution antiseptique étudiée. On complète alors au volume constant de 5 centimètres cubes, avec de l'eau distillée stérile, et on agite soigneusement chaque tube. Nous avons donc finalement des tubes de bouillon peptoné salé contenant, par centimètre cube, 10 millions de germes et des quantités croissantes de solution antiseptique. Le bouillon double, dilué de moitié, se trouve ramené à la concentration normale.

Chaque tube est capuchonné au caoutchouc et la série est laissée durant quinze jours à la température du laboratoire. Au bout de ce temps, les substances ont eu le temps d'exercer leur action antigénétique. Les tubes sont alors placés à l'étuve à 37° pendant quatre jours, pour s'assurer qu'aucun développement ultérieur ne se produit.

Un tube additionné de germes, mais sans antiseptique, servant de témoin, permet de constater le développement des germes normaux.

Au bout du 20^e jour, la lecture des résultats peut être effectuée. On note la dose de substance antiseptique contenue dans le dernier tube de la série qui a cultivé et la dose contenue dans le tube suivant, c'est-à-

dire dans le premier de la série resté stérile. La moyenne des deux chiffres est considérée comme la dose antigénétique du produit. On la rapporte au litre.

Il est bien évident, comme nous l'avons déjà dit, que, si l'on n'a aucune idée de l'activité antigénétique du corps étudié, on ne peut avoir un résultat au premier essai. Il faut, dans ce cas, procéder par tâtonnements, en utilisant d'abord des doses d'antiseptiques assez espacées, afin de déterminer tout d'abord l'échelle des doses actives. On effectue ensuite de nouveaux essais, en resserrant chaque fois un peu plus les doses d'antiseptique, jusqu'à obtention d'un résultat suffisamment précis.

La dose antigénétique (x) étant obtenue, le pouvoir antigénétique de la substance est calculé en établissant le rapport $\frac{1}{x}$. Ainsi, les substances les plus actives sont, comme nous l'avons déjà noté, caractérisées par les chiffres de pouvoirs antigénétiques les plus forts. Si donc l'on considère seulement les doses antigénétiques, il faut bien se rappeler qu'elles varient en sens inverse de l'activité.

L'essai antigénétique est effectué de la même façon pour les espèces bactériennes suivantes : staphylocoque, colibacille et bacilles typhiques, *Bacillus subtilis*.

Dans le cas du bacille diphtérique, cet essai doit évidemment être effectué en présence d'une certaine quantité d'albumine sans laquelle le milieu serait impropre à la culture des germes. On remplace donc, dans ce cas, le bouillon simple par le bouillon additionné de liquide d'ascite.

Nous donnons ci-dessous un exemple de détermination de la dose antigénétique :

DÉTERMINATION DE LA DOSE ANTIGÉNÉTIQUE DE L'IODE VIS-A-VIS DU STAPHYLOCOQUE DORÉ

Il s'agit de déterminer la dose antigénétique de l'iode vis-à-vis du staphylocoque doré. Pour cela, nous avons d'abord préparé une solution d'iode dans l'iodure de potassium, selon la formule suivante : iode, 1 gramme ; iodure de potassium, 2 grammes ; eau distillée, 100 centimètres cubes.

Ayant, d'autre part, une culture de staphylocoques, sur bouillon gélosé, âgée de 24 heures et préparée comme il a été indiqué ci-dessus, nous avons préparé une suspension de ces germes dans l'eau distillée stérile. La numération des germes nous a montré que cette suspension contenait, par centimètre cube, 200 millions de germes, par exemple. Si nous voulons introduire dans chaque tube en expérience 50 millions de germes, nous devons donc y mettre 0^{cc},25 de cette suspension.

Ayant disposé une série de tubes contenant chacun 2^{cc},5 de bouillon double, nous introduisons donc, dans chacun, 0^{cc},25 de suspension de staphylocoque et des quantités croissantes de la solution iodo-iodurée

(0^{cc},05, 0^{cc},10, 0^{cc},20, 0^{cc},30, 0^{cc},40, 0^{cc},50..., 1 centimètre cube). Nous ajoutons enfin, dans chaque tube, une quantité suffisante d'eau distillée stérile pour avoir un volume total de 5 centimètres cubes. Nous agitons soigneusement chaque tube, que nous capuchonnons ensuite au caoutchouc. La série de tubes est abandonnée durant 15 jours, à la température du laboratoire, puis placée, durant 4 jours, à l'étuve à 37°. On note alors les tubes dans lesquels les germes se sont développés.

Le dispositif de l'essai peut être schématisé de la façon suivante :

TABLEAU XXII

<i>Tubes :</i>	N° 1	N° 2	N° 3	N° 4	N° 5	N° 6	N° 7	N° 8
	cm ³	cm ³	cm ³	cm ³	cm ³	cm ³	cm ³	cm ³
Bouillon double	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Suspension de staphylocoques.....	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Solution iodo-iodurée.....	0,05	0,10	0,20	0,30	0,40	0,50	0,75	1,0
Eau distillée stérile	2,2	2,15	2,05	1,95	1,85	1,75	1,5	1,25
Volume total.....	5	5	5	5	5	5	5	5
Lecture des résultats	+	+	O	O	O	O	O	O

+ = Culture positive.

O = Culture négative.

Cet essai nous permet donc de conclure que la quantité de solution iodo-iodurée, à 1 p. 100 d'iode, suffisante pour inhiber le développement des germes contenus dans 5 centimètres cubes de milieu, est comprise entre 0^{cc},10 et 0^{cc},20. La dose antigénétique (rapportée au litre) de cette solution est donc comprise entre $(0,10 \times 200) = 20$ centimètres cubes et $(0,20 \times 200) = 40$ centimètres cubes, c'est-à-dire entre 0g,20 et 0g,40 d'iode.

Il nous faut évidemment arriver à une valeur plus approchée. Pour ceci, nous effectuerons donc d'autres essais semblables, en mettant en expérience des doses d'iode intermédiaires entre 0g,20 et 0g,40 par litre. Nous introduirons, par exemple, dans les 5 centimètres cubes de volume total, des quantités de solution iodo-iodurées de : 0^{cc},10, 0^{cc},12, 0^{cc},14, 0^{cc},16, 0^{cc},18, 0^{cc},20. Afin d'éviter les erreurs de mesure sur d'aussi faibles quantités, nous diluerons la solution iodo-iodurée au 1/10, avec de l'eau distillée, et nous en utiliserons des quantités de : 1 centimètre cube, 1^{cc},2, 1^{cc},4, 1^{cc},6, 1^{cc},8, 2 centimètres cubes. Il faudra, évidemment, modifier les quantités d'eau distillée stériles ajoutées pour compléter le volume à 5 centimètres cubes.

Le dispositif de l'essai sera alors le suivant :

<i>Tubes :</i>	N° 1	N° 2	N° 3	N° 4	N° 5	N° 6
	cm ³	cm ³	cm ³	cm ³	cm ³	cm ³
Bouillon double	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Suspension de staphylocoques	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Solution iodo-iodurée, diluée au 1/10	1	1,20	1,40	1,60	1,80	2
Eau distillée stérile.....	1,25	1,05	0,85	0,65	0,45	0,25
Volume total	5	5	5	5	5	5
Lecture des résultats.....	+	+	+	+	O	O

Dans cet essai, la quantité de solution iodo-iodurée (diluée au 1/10, soit à 0,10 p. 100 d'iode), suffisante pour inhiber le développement des germes contenus dans 5 centimètres cubes de bouillon, est comprise entre 1^{cc},6 et 1^{cc},8. La dose antigénétique de cette solution est donc comprise entre : $(1,6 \times 200) = 320$ centimètres cubes et $(1,8 \times 200) = 360$ centimètres cubes, ce qui correspond à 0g,36 et à 0g,38 d'iode. Nous pouvons donc admettre comme dose antigénétique de l'iode, trouvée dans cet essai, la dose de $\frac{0,36 + 0,38}{2} = 0g,37$.

Nous donnons ci-dessous quelques valeurs antigénétiques vis-à-vis du *staphylocoque*.

Les chiffres de la première colonne représentent les *doses antigénétiques*, c'est-à-dire les doses de substance qu'il suffit d'ajouter à 1 litre de bouillon de culture, contenant 10 millions de germes par centimètre cube, pour y empêcher leur développement dans les conditions optima.

Les chiffres de la deuxième colonne représentent l'inverse de ces doses, soit les *pouvoirs antigénétiques*. Les valeurs données dans les tableaux suivants représentent toutes les moyennes de plusieurs déterminations.

TABLEAU XXIII

EXEMPLES DE VALEURS ANTIGÉNÉTIQUES VIS-A-VIS DU
STAPHYLOCOQUE DORÉ.

<i>Antiseptiques :</i>	Doses antigénétiques (grammes).	Inverse de la dose antigénétique. Pouvoir antigénétique.
Eau de chlore (en Cl)	0,26	3,8
Liqueur de Labarraque (en Cl).....	0,26	3,8
Eau de brome (en Br)	0,68	1,4
Eau iodo-iodurée (en I)	0,40	2,5
Bichlorure de mercure	0,07	19,9
Thymol	0,10	10,0
Formol à 30 p. 100	0,13	7,6
Sulfate de cuivre	0,65	1,5
Phénol	2,6	0,38
Résorcine	4,0	0,25

Les valeurs ci-dessus nous permettent de constater que l'activité antigénétique de diverses substances varie dans de larges limites. Très marquée, par exemple, pour le bichlorure de mercure, cette activité est assez prononcée pour le thymol, le formol, le chlore, le brome, l'iode et le sulfate de cuivre. Elle est, par contre, relativement restreinte dans le cas du phénol et de la résorcine.

III. — DÉTERMINATION DE LA DOSE ANTIBIOTIQUE D'UNE SUBSTANCE CHIMIQUE PAR LA TECHNIQUE DIRECTE, AVEC ÉVALUATION DE LA VALIDITÉ DE L'ESSAI

A. — EXPOSÉ DE LA TECHNIQUE

Le *pouvoir antibiotique* d'une substance, vis-à-vis d'un microbe donné, est la faculté que possède cette substance de détruire définitivement ce germe, dans un milieu donné, de telle sorte qu'il ne puisse plus se développer ultérieurement dans un milieu où se trouvent réalisées les conditions optima.

Nous le représentons par la *dose antibiotique*, c'est-à-dire par la dose de cette substance qu'il suffit d'ajouter à un litre d'un milieu déterminé pour tuer, en un temps donné, une quantité connue de germes (500 millions par centimètre cube). *Le pouvoir antibiotique d'une substance, vis-à-vis d'un germe donné, est donc d'autant plus grand que la dose antibiotique de cette substance est elle-même plus petite.*

La détermination de la dose antibiotique d'une substance est effectuée de la façon suivante :

D'une façon générale, la dose antibiotique d'une substance est déterminée en laissant en contact, durant 15 minutes, dans un milieu déterminé, des quantités croissantes de cette substance et des quantités constantes de germes (500 millions par centimètre cube). Après ce temps, une quantité constante du mélange (1/10 de centimètre cube) est repiquée dans 5 centimètres cubes de milieu de subculture, afin de permettre le développement, dans ce milieu neuf, des germes restés vivants.

Il y a donc lieu de noter ici, non seulement comme pour l'essai antigénétique, l'*espèce microbienne* sur laquelle est effectuée la détermination, mais aussi le *milieu* dans lequel s'exerce l'action antibiotique. Nous venons de voir qu'elle pouvait, particulièrement, s'exercer dans quatre milieux différents :

- 1° En eau distillée ;
- 2° En eau physiologique ;
- 3° En milieux albumineux ;

4° En milieu complexe (bouillon peptoné salé), de même formule que celui utilisé pour la détermination de la dose antigénétique.

Nous allons examiner maintenant comment s'effectue la détermination du pouvoir antibiotique, en eau distillée, en eau physiologique, en eau albumineuse et en bouillon peptoné salé. Nous choisirons, à titre d'exemple, la détermination du pouvoir antibiotique de l'iode (en solution aqueuse iodo-iodurée), dans ces différents milieux, vis-à-vis du staphylocoque doré (1).

(1) Nous avons généralement effectué nos essais sur un volume total de 5 centimètres cubes pour chaque dose de substance antiseptique mise en œuvre. Il est bien évident que ce volume n'a rien d'absolu et qu'il peut être modifié à volonté. Mais il importe de bien respecter, dans chaque cas, tous les rapports numériques établis. Nous en verrons plus loin l'importance, quand nous discuterons la validité de la méthode.

**1^o Détermination du pouvoir antibiotique
vis-à-vis du staphylocoque doré.**

a) EN EAU DISTILLÉE

La solution aqueuse iodo-iodurée contenant 1 p. 100 d'iode est préparée selon la formule ci-dessus donnée.

La suspension microbienne est préparée, en eau distillée stérile, avec les germes fournis par une culture de staphylocoques sur bouillon gélosé, âgée de 24 heures, à 37°, et préparée comme il a été indiqué ci-dessus. Supposons que la numération des germes de cette suspension nous ait montré qu'elle contenait par centimètre cube 5 milliards de germes. Si nous voulons introduire, dans les 5 centimètres cubes de milieu d'essai, 500 millions de germes par centimètre cube (c'est-à-dire, au total, 2 500 millions de germes), nous devons y mettre 0^{cc},5 de la suspension microbienne que nous avons préparée.

Ayant disposé une série de 10 tubes stériles, on introduit dans chacun les quantités préalablement calculées d'eau distillée stérile et de solution iodo-iodurée nécessaires pour avoir, après addition de la suspension microbienne, un volume total de 5 centimètres cubes dans chacun. On mélange soigneusement, par agitation, et on ajoute dans chaque tube 0^{cc},5 de suspension microbienne. On mélange de nouveau, et on laisse, exactement pendant 15 minutes, en repos, à la température de 20° C. 15 minutes après l'introduction des germes dans le tube n° 1, on prélève, dans chaque tube, à l'aide de pipettes stériles, 1/10 de centimètre cube du mélange que l'on ensemence dans 5 centimètres cubes de bouillon de subculture.

(Chaque tube de subculture reçoit donc par centimètre cube 10 millions de germes, soit, au total, 50 millions de germes, ou 1/50 du mélange : germes-désinfectant.)

Les tubes de subculture sont placés à l'étuve à 37° C., jusqu'à ce que le nombre des tubes dans lesquels se développent les germes reste constant. Ce résultat est généralement atteint après 3 à 4 jours.

On note alors la dose de substance antiseptique contenue dans le dernier tube de la série dont la subculture a été positive ; on note la dose de substance antiseptique contenue dans le tube suivant, c'est-à-dire dans le premier tube de la série dont la subculture a été négative. La moyenne de ces deux chiffres, rapportée au litre d'eau distillée, est considérée comme la dose antibiotique de la substance.

Le dispositif de l'essai peut être schématisé de la façon suivante :

TABLEAU XXIV

DÉTERMINATION DE LA DOSE ANTIBIOTIQUE DE L'IODE, EN EAU DISTILLÉE,
VIS-A-VIS DU STAPHYLOCOQUE DORÉ

<i>Tubes :</i>	N° 1	N° 2	N° 3	N° 4	N° 5	N° 6	N° 7	N° 8	N° 9	N° 10
	cm ³	cm ³	cm ³	cm ³	cm ³	cm ³	cm ³	cm ³	cm ³	cm ³
Eau distillée stérile	4,45	4,4	4,3	4,2	4,1	4	3,5	2,5	1,5	0,5
Solution iodo-iodurée (1 p. 100) diluée au 1/100	0,05	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	1,0	2,0	3,0	4,0
Suspension de staphylocoques à 5 milliards de germes par centi- mètre cube	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Volume total	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Résultat des subcultures.....	+	+	+	+	+	+	O	O	O	O

Cet essai nous permet de conclure que la quantité de solution iodo-iodurée (contenant 1 p. 100 d'iode, et diluée au 1/100) suffisante pour tuer en 15 minutes les germes contenus dans 5 centimètres cubes d'eau distillée, est comprise entre 0^{cc},50 et 1 centimètre cube.

La dose antibiotique (rapportée au litre) de cette solution est donc comprise entre $\frac{(0,5 \times 200)}{100} = 1$ centimètre cube et $\frac{(1 \times 200)}{100} = 2$ centimètres cubes, c'est-à-dire entre 0g,010 et 0g,020 d'iode.

Si nous voulons avoir un résultat plus précis, nous ferons un autre essai en mettant en expérience des quantités voisines de solution iodo-iodurée (à 1 p. 100 d'iode, et diluée au 1/100 avec de l'eau distillée) comprises entre 0^{cc},5 et 1 centimètre cube.

Le dispositif de l'essai sera alors le suivant :

TABLEAU XXV

<i>Tubes :</i>	N° 1	N° 2	N° 3	N° 4	N° 5	N° 6	N° 7	N° 8	N° 9	N° 10
	cm ³	cm ³	cm ³	cm ³	cm ³	cm ³	cm ³	cm ³	cm ³	cm ³
Eau distillée stérile	4	3,95	3,9	3,85	3,8	3,75	3,7	3,65	3,6	3,5
Solution iodo-iodurée (1 p. 100) diluée au 1/100	0,5	0,55	0,6	0,65	0,7	0,75	0,8	0,85	0,9	1
Suspension de staphylocoques à 5 milliards de germes par centimètre cube	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Volume total	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Résultat des subcultures	+	+	+	+	+	+	O	O	O	O

Ainsi la quantité de solution iodo-iodurée (contenant 1 p. 100 d'iode, et diluée au 1/100), qui a suffi à tuer en 15 minutes les germes contenus dans 5 centimètres cubes d'eau distillée, est comprise entre 0^{cc},75 et 0^{cc},80. La dose antibiotique (rapportée au litre) de cette solution est donc comprise entre $\frac{(0,75 \times 200)}{100} = 1^{\text{cc}},5$ et $\frac{(0,8 \times 200)}{100} = 1^{\text{cc}},6$, ce qui fait, en iode, de 0g,015 à 0g,016.

Afin de permettre un rapprochement avec les exemples donnés, au cours du premier chapitre, au sujet des méthodes du coefficient phénol, nous donnons encore ci-dessous un exemple de détermination de la dose antibiotique du phénol, en eau distillée, selon notre technique.

TABLEAU XXVI

DÉTERMINATION DE LA DOSE ANTIBIOTIQUE DU PHÉNOL, EN EAU DISTILLÉE, VIS-A-VIS DU STAPHYLOCOQUE

<i>Tubes :</i>	N° 1	N° 2	N° 3	N° 4	N° 5	N° 6	N° 7	N° 8
	cm ³	cm ³	cm ³	cm ³	cm ³	cm ³	cm ³	cm ³
Eau distillée stérile.....	4,2	4,1	4	3,9	3,8	3,7	3,45	3,2
Suspension microbienne	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
Solution de phénol à 5 p. 100 ...	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1	1,25	1,5
Volume total	5	5	5	5	5	5	5	5
Résultat des subcultures	+	+	+	+	+	+	O	O

La quantité de solution de phénol suffisante pour tuer les germes en 15 minutes dans 5 centimètres cubes de milieu (eau distillée) est donc, dans cet exemple, comprise entre 1 et 1^{cc},25 (de solution à 5 p. 100). La dose antibiotique de phénol (par litre d'eau distillée) est donc de :

$$\frac{1 + 1,25}{2} \times \frac{200}{100} \times 5, \text{ soit } 11\text{g},25.$$

b) EN EAU PHYSIOLOGIQUE

La détermination de la dose antibiotique en eau physiologique, vis-à-vis du staphylocoque, est exactement semblable à cette détermination en eau distillée.

Voici, à titre d'exemple, un essai de détermination de la dose antibiotique de l'iode, en eau physiologique, vis-à-vis du staphylocoque.

TABLEAU XXVII

<i>Tubes :</i>	N° 1	N° 2	N° 3	N° 4	N° 5	N° 6	N° 7	N° 8	N° 9	N° 10
	cm ³	cm ³	cm ³	cm ³	cm ³	cm ³	cm ³	cm ³	cm ³	cm ³
Eau physiologique (1).....	3,2	3,15	3,1	3,05	3,0	2,95	2,9	2,85	2,8	2,75
Solution iodo-iodurée (1 p. 100) diluée au 1/100	1,3	1,35	1,4	1,45	1,5	1,55	1,6	1,65	1,7	1,75
Suspension de staphylocoques à 5 milliards de germes par centimètre cube	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Volume total.....	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Résultat des subcultures...	+	+	+	O	O	O	O	O	O	O

(1) Pour remédier à l'abaissement de la concentration saline dans le milieu d'essai (par apport de la suspension microbienne en eau distillée), on augmente, dans les proportions nécessaires, la concentration en NaCl de l'eau physiologique.

Ainsi, la quantité de solution iodo-iodurée (contenant 1 p. 100 d'iode et diluée au 1/100), qui a suffi à tuer en 15 minutes les germes contenus dans 5 centimètres cubes d'eau physiologique, est comprise entre 1^{cc},4 et 1^{cc},45. La dose antibiotique, rapportée au litre, de cette solution est donc comprise entre : $\frac{(1,4 \times 200)}{100} = 2^{\text{cc}},8$ et $\frac{(1,45 \times 200)}{100} = 2^{\text{cc}},9$, ce qui fait, en iode, de 0g,028 à 0g,029.

c) EN MILIEU ALBUMINEUX

La détermination de la dose antibiotique en milieu albumineux est effectué selon la technique suivante :

Dans une série de tubes à essais stériles et vides, on introduit 5 centimètres cubes de liquide d'ascite stérile et une quantité d'eau physiologique telle que le volume final, après addition des germes et du désinfectant, soit de 10 centimètres cubes.

On ajoute alors successivement les quantités préalablement calculées de suspension microbienne et de solution désinfectante, et l'on termine l'essai comme précédemment.

Il importe spécialement, dans ce cas, de ne pas introduire le désinfectant avant les germes dans le milieu d'essai. Certaines substances pourraient, en effet, être fixées par les matières albumineuses du milieu avant d'avoir pu agir sur les germes.

Nous donnons ci-dessous, à titre d'exemple, un essai de détermination de la dose antibiotique d'iode, en milieu albumineux, vis-à-vis du staphylocoque.

TABLEAU XXVIII

<i>Tubes :</i>	N° 1	N° 2	N° 3	N° 4	N° 5	N° 6	N° 7
	<u>cm³</u>	<u>cm³</u>	<u>cm³</u>	<u>cm³</u>	<u>cm³</u>	<u>cm³</u>	<u>cm³</u>
Liquide d'ascite	5	5	5	5	5	5	5
Eau physiologique	4,45	4,4	4,3	4,2	4,1	4	3,5
Suspension microbienne	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Solution iodo-iodurée contenant 1 p. 100 d'I.....	0,05	0,10	0,20	0,30	0,40	0,50	1
Volume total.....	10	10	10	10	10	10	10
Résultat des subcultures.....	+	+	+	+	+	O	O

Dans cet essai, la dose de solution iodo-iodurée suffisant à tuer en 15 minutes les staphylocoques dans 10 centimètres cubes en milieu albumineux est donc comprise entre 0^{cc},40 et 0^{cc},50.

La dose antibiotique en milieu albumineux, vis-à-vis du staphylocoque, est donc : $\frac{0,40 + 0,50}{2} \times 100 = 45$ centimètres cubes, soit 0g,45 en iode.

d) EN BOUILLON PEPTONÉ SALÉ

La détermination de la dose antibiotique en bouillon peptoné salé est effectuée de la façon suivante :

On dispose une série de tubes contenant chacun 2^{cc},5 de bouillon peptoné salé à double concentration, et on introduit dans chacun des quantités d'eau distillée stérile suffisantes pour que, après addition de la solution antiseptique et des germes, le volume total, dans chaque tube, soit de 5 centimètres cubes.

On ajoute alors successivement les quantités préalablement calculées de suspension microbienne et de solution désinfectante ; on mélange soigneusement le contenu de chaque tube et on laisse en repos pendant un quart d'heure. L'essai est terminé comme dans le cas de la détermination de la dose antibiotique en eau distillée.

Ici, comme dans le cas de l'essai en milieu albumineux, il est préférable de ne pas introduire le désinfectant avant les germes dans le milieu d'essai, afin d'éviter que la substance désinfectante ne soit totalement fixée par ce milieu avant d'avoir pu agir sur les germes.

Nous donnons ci-dessous le dispositif schématique d'un essai en bouillon peptoné salé.

TABLEAU XXIX

DÉTERMINATION DE LA DOSE ANTIBIOTIQUE DE L'IODE, EN BOUILLON PEPTONÉ SALÉ, VIS-A-VIS DU STAPHYLOCOQUE

Tubes :	N° 1	N° 2	N° 3	N° 4	N° 5	N° 6	N° 7	N° 8
	cm ³	cm ³	cm ³	cm ³	cm ³	cm ³	cm ³	cm ³
Eau distillée stérile.....	1,4	1,35	1,3	1,25	1,2	1,15	1,1	1
Bouillon à double concentration	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Suspension de staphylocoques à 5 milliards par centimètre cube	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Solution iodo-iodurée (1 p. 100 d'iode) ...	0,6	0,65	0,7	0,75	0,8	0,85	0,9	1
Volume total	5	5	5	5	5	5	5	5
Résultat des subcultures.....	+	+	+	O	O	O	O	O

Ainsi, la quantité de solution iodo-iodurée (contenant 1 p. 100 d'iode), qui a suffi à tuer en 15 minutes les germes contenus dans 5 centimètres cubes de bouillon peptoné salé, est comprise entre 0^{cc},7 et 0^{cc},75.

La dose antibiotique (rapportée au litre) de cette solution est donc comprise entre $(0,7 \times 200) = 140$ centimètres cubes et $(0,75 \times 200) = 150$ centimètres cubes, c'est-à-dire entre 1^g,4 et 1^g,5 d'iode.

2° Détermination de la dose antibiotique vis-à-vis du colibacille.

Toutes les conditions de détermination de la dose antibiotique vis-à-vis du staphylocoque sont valables pour les essais effectués avec le colibacille comme organisme témoin aussi bien en eau distillée qu'en eau physiologique, en milieu albumineux et en bouillon peptoné.

3^o Détermination de la dose antibiotique vis-à-vis du bacille diphtérique.

Les conditions de cet essai sont identiques, dans l'ensemble, aux précédentes. Cependant quelques légères modifications ont dû être apportées en raison des propriétés culturales plus difficiles de ce germe.

Les souches de bacille diphtérique sont, comme nous l'avons déjà dit, conservées en bouillon ascite et repiquées tous les mois sur ce milieu; au moment de l'essai, les souches sont repiquées successivement pendant 3 jours sur gélose ascite. La dernière de ces trois cultures, âgée de 24 heures, à 37°, est utilisée pour la préparation de l'émulsion microbienne.

Les subcultures des bacilles traités par le désinfectant sont effectuées en bouillon ascite. Nous avons donné précédemment la composition de ces différents milieux.

Toutes les autres conditions de l'essai sont identiques aux conditions précédemment décrites pour le staphylocoque.

4^o Détermination de la dose antibiotique vis-à-vis des spores de « *Bacillus subtilis* ».

L'utilisation d'une forme sporulée entraîne également quelques modifications de technique.

Les souches de *Bacillus subtilis* sont conservées en bouillon et repiquées tous les mois sur ce milieu. Les formes sporulées entrant seules en ligne de compte pour l'essai, il importe d'assurer la sporulation en préparant au moins 5 jours à l'avance les cultures destinées à l'essai. Il faut également disposer d'une grande quantité de germes, et, pour cela, il convient d'utiliser non pas des cultures sur gélose inclinée en tubes, comme pour les autres germes, mais des cultures sur plaques de gélose.

La numération de la suspension bactérienne doit porter uniquement sur les éléments sporulés.

Enfin, pour l'essai antibiotique, le temps de contact entre l'antiseptique et les spores doit être prolongé. En effet, la plupart des désinfectants n'exercent en un quart d'heure qu'une action insignifiante sur les éléments sporulés; d'autre part, on ne peut mettre en œuvre que des concentrations de substances antiseptiques compatibles avec les conditions de l'essai.

A la suite de nombreux essais, nous nous sommes arrêtée au temps de 12 heures pour l'action des désinfectants sur les formes sporulées. Les autres conditions de l'essai sont identiques à celles adoptées pour les autres germes.

B. — VALEURS ANTIBIOTIQUES DE QUELQUES CORPS CHIMIQUES, ÉTUDIÉES A L'AIDE DE LA « TECHNIQUE DIRECTE »

Nous allons maintenant donner, à titre d'exemples, les résultats de la détermination des valeurs antibiotiques de quelques corps chimiques

choisis parmi les antiseptiques couramment employés, et dont nous avons déjà donné les valeurs antigénétiques.

Les solutions désinfectantes utilisées pour ces essais sont identiques à celles que nous avons utilisées pour la détermination des valeurs antigénétiques.

Les espèces microbiennes mises en expérience ont été : le staphylocoque, le colibacille, les bacilles typhique et paratyphique, le bacille diphtérique et les spores de *Bacillus subtilis*.

Les différents liquides utilisés comme milieux intermédiaires des essais ont été les milieux ci-dessus nommés : eau distillée, eau physiologique, eau albumineuse, bouillon peptoné salé, ainsi que la macération de viande de bœuf que nous avons utilisée pour les essais spéciaux sur des germes d'âges différents, essais dont nous avons déjà parlé au cours du deuxième chapitre (p. 91).

Dans les tableaux suivants, nous donnons, pour chaque substance, pour chaque milieu intermédiaire, et pour chaque espèce microbienne, la *dose antibiotique* (ou dose de substance qu'il suffit d'ajouter à 1 litre d'un de ces milieux pour y tuer en 15 minutes un nombre de germes de 500 millions par centimètre cube), et le *pouvoir antibiotique* ou inverse de cette dose.

TABEAU XXX

EXEMPLES DE VALEURS ANTIBIOTIQUES VIS-A-VIS DU STAPHYLOCOQUE DORÉ.

Désinfectants.	MILIEUX INTERMÉDIAIRES									
	Eau distillée.		Eau physiologique.		Eau albumineuse.		Macération de viande.		Bouillon peptoné salé.	
	Doses antibiot.	Pouvoirs antibiot.	Doses antibiot.	Pouvoirs antibiot.	Doses antibiot.	Pouvoirs antibiot.	Doses antibiot.	Pouvoirs antibiot.	Doses antibiot.	Pouvoirs antibiot.
	(grs.).		(gr.).		(grs.).		(grs.).		(grs.).	
Eau de chlore (en Cl.).....	0,006	166,6	0,008	125	0,71	1,4	»	»	0,74	1,3
Liq. de Labarraque (en Cl.) .	0,007	142,3	0,005	200	0,39	2,5	»	»	1,25	0,8
Eau iodo-iodurée (en I).....	0,013	76,9	0,029	34,4	0,41	2,4	0,11	9,1	1,35	0,74
Eau de brome (en Br.)	0,046	21,7	0,021	47,6	4,6	0,21	»	»	10,9	0,8
HgCl ²	0,11 ⁽¹⁾	9,0	0,125	8,0	0,43	2,3	0,31	3,2	0,45	2,2
Phénol	10,3	0,09	12	0,08	12	0,08	10,15	0,09	12,5	0,08

(1) Au début de nos essais, nous avions trouvé, pour HgCl², une dose antibiotique en eau distillée inférieure à celle-ci. Nous avons vu que ce fait devait être attribué à une insuffisante durée d'observation des subcultures.

TABEAU XXXI

EXEMPLES DE VALEURS ANTIBIOTIQUES VIS-A-VIS DU BACILLE DIPHTHÉRIQUE

Désinfectants.	MILIEUX INTERMÉDIAIRES			
	Eau distillée.		Eau albumineuse.	
	Doses antib.	Pouv. antib.	Doses antib.	Pouv. antib.
	(grammes).		(grammes).	
Eau de chlore (en Cl).....	0,014	71,4	»	»
Liq. de Labarraque.....	0,020	50	0,41	2,4
Eau de brome (en Br.).....	0,07	14,2	4,6	0,21
Eau iodo-iodurée (en I).....	0,008	125	0,42	2,3
HgCl ²	0,022	45,4	0,08	12,5
Phénol	7	0,14	15	0,06

TABEAU XXXII

EXEMPLES DE VALEURS ANTIBIOTIQUES VIS-A-VIS DU COLIBACILLE

Désinfectants.	MILIEUX INTERMÉDIAIRES			
	Eau distillée.		Eau albumineuse.	
	Doses antibiotiques.	Pouvoirs antibiotiques.	Doses antibiotiques.	Pouvoirs antibiotiques.
	(grammes).		(grammes).	
Eau de chlore (en Cl)	0,0027	370,3	0,29	3,4
Liq. de Labarraque (en Cl). ...	0,002	500	0,21	4,7
Eau de Brome (en Br).	0,007	142,8	5,4	0,18
Eau iodo-iodurée (en I)	0,003	333,3	0,21	4,7
Bichlorure de mercure	0,005	200	0,06	16,6
Phénol	17	0,05	14	0,07

Le tableau suivant, dans lequel sont groupées les valeurs antibiotiques de ces diverses substances, en eau distillée, vis-à-vis de différentes formes végétatives, permettra de comparer plus facilement les résultats obtenus avec les différents germes (tableau xxxiii).

Nous donnons ci-dessous les résultats de quelques essais de *valeurs antibiotiques vis-à-vis des spores de Bacillus subtilis*.

TABLEAU XXXIII
TABLEAU COMPARATIF DES VALEURS ANTIBIOTIQUES EN EAU DISTILLÉE, VIS-A-VIS DE DIFFÉRENTS GERMES
(formes végétales).

Désinfectants.	Staphylocoque.		B. diphtérique.		Colibacille.		B. typhique.		Paratyphique A.		Paratyphique B.	
	Doses antibiot. (grs)	Pouv. antibiot.	Doses antibiot. (grs)	Pouv. antibiot.	Doses antibiot. (grs)	Pouv. antibiot.	Doses antibiot. (grs)	Pouv. antibiot.	Doses antibiot. (grs)	Pouv. antibiot.	Doses antibiot. (grs)	Pouv. antibiot.
Eau de chlore (en Cl).	0,006	166,6	0,014	71,4	0,0027	370,3	0,002	500	0,003	333,3	0,004	350
Liq. de Labarraque (en Cl).	0,007	142,3	0,020	50	0,002	500	0,002	500	0,002	500	0,005	200
Eau de Brome (en Br).	0,046	21,7	0,07	14,2	0,007	142,8						
Eau iodo-iodurée (en I).	0,013	76,9	0,008	125	0,003	333,3	0,003	333,3	0,003	333,3	0,004	250
Bichlorure de mercure.	0,11	9,0	0,022	45,4	0,005	200						
Phénol	10,3	0,09	7	0,14	17	0,05						

TABLEAU XXXIV

EXEMPLES DE VALEURS ANTIBIOTIQUES VIS-A-VIS DU BACILLUS SUBTILIS.

Désinfectants.	MILIEU INTERMÉDIAIRE : Eau distillée, (Temps d'action : 12 heures.)	
	Doses antibiotiques (grammes).	Pouvoirs antibiotiques.
Eau de chlore (en Cl).....	0,20	5
Liqueur de Labarraque (en Cl) ...	1,3	0,76
Eau de brome (en Br).....	2,1	0,47
Eau iodo-iodurée (en I).....	1,07	0,93
Bichlorure de mercure	0,28	3,5
Phénol	plus de 15	moins de 0,02

C. — QUELQUES REMARQUES A PROPOS DES CHIFFRES CONTENUS DANS CES TABLEAUX

Les résultats ci-dessus donnés nous amènent à faire quelques remarques, sur lesquelles nous n'insisterons pas, puisque notre seul but est de mettre au point des méthodes de mesure de l'activité antimicrobienne. Mais ces constatations feront mieux ressortir l'intérêt qu'il y avait à effectuer les essais dans telle ou telle condition déterminée. Certaines d'entre elles ont, d'ailleurs, déjà été faites et énoncées au cours de notre deuxième chapitre.

1^o Non seulement la valeur antibiotique d'un même antiseptique dans un même milieu varie dans de larges limites si l'on s'adresse, pour la déterminer, à des *espèces microbiennes différentes*, mais encore l'ordre d'activité des différents antiseptiques n'est pas le même pour chaque espèce microbienne considérée. Certaines espèces sont plus résistantes à certains antiseptiques, alors que d'autres bactéries résistent mieux à d'autres antiseptiques. Ainsi, si nous établissons, pour chaque groupe de corps essayé, l'ordre de sensibilité décroissante vis-à-vis des différents germes, nous obtenons respectivement les séries suivantes, où les premiers termes représentent les bactéries qui résistent le moins, et les derniers termes celles qui résistent le plus.

<u>Chlore.</u>	<u>Brome.</u>	<u>Iode.</u>	<u>Sublimé.</u>	<u>Phénol.</u>
Colibacille.	Colibacille.	Colibacille.	Colibacille.	B. diphtérique.
Staphylocoque.	Staphylocoque.	B. diphtérique.	Staphylocoque.	Staphylocoque.
B. diphtérique.	B. diphtérique.	Staphylocoque.	B. diphtérique.	Colibacille.

Si nous établissons pour chaque espèce bactérienne l'ordre d'activité

des diverses substances étudiées, nous obtenons, par ordre d'activité décroissante, les valeurs suivantes :

<i>Staphylocoque.</i>	<i>Bacille diphtérique.</i>	<i>Colibacille.</i>
Chlore.	Iode.	Chlore et iode.
HgCl ² et iode.	Chlore.	HgCl ² .
Brome.	HgCl ² .	Brome.
Phénol.	Brome.	Phénol.
	Phénol.	

1° Les valeurs antibiotiques d'un même antiseptique, vis-à-vis d'une même espèce microbienne, mais en présence de *milieux intermédiaires différents*, sont très dissemblables :

a) *La présence d'albumine*, qui atténue très fortement l'activité de certaines substances, influence beaucoup moins celle d'autres corps.

Il nous a paru intéressant de calculer cette atténuation pour les substances étudiées. Nous donnons donc, dans le tableau suivant, les rapports des pouvoirs antibiotiques de ces substances en eau distillée et en milieu albumineux. Ces rapports, obtenus en prenant comme numérateurs les pouvoirs antibiotiques en eau distillée, et comme dénominateurs les pouvoirs antibiotiques en milieu albumineux, expriment donc combien de fois le corps considéré se montre plus actif en eau qu'en milieu albumineux, ou, ce qui revient au même, la grandeur de l'atténuation apportée par l'albumine sur l'activité antibiotique.

TABLEAU XXXV

<i>Désinfectants.</i>	<i>Staphylocoque.</i>	<i>Colibacille.</i>	<i>Bacille diphtérique.</i>
Eau de chlore (en Cl).....	$\frac{166,6}{1,4} = 119$	$\frac{370,3}{3,4} = 108$	
Liquueur de Labarraque (en Cl) ...	$\frac{142,5}{2,5} = 57$	$\frac{500}{4,7} = 106$	$\frac{50}{2,4} = 20,8$
Eau de brome (en Br).....	$\frac{21,7}{0,21} = 103$	$\frac{142,8}{0,18} = 788$	$\frac{14,2}{0,21} = 67$
Eau iodo-iodurée (en I).....	$\frac{76,9}{2,4} = 32$	$\frac{333,3}{4,7} = 70$	$\frac{125}{2,3} = 54$
HgCl ²	$\frac{9,01}{2,3} = 3,9$	$\frac{200}{16,6} = 12$	$\frac{45,4}{12,5} = 3,6$
Phénol.....	$\frac{0,09}{2,08} = 1,12$	$\frac{0,05}{0,07} = 0,7$	$\frac{0,14}{0,06} = 2,3$

Nous voyons que, d'une façon générale, la présence d'albumine dans le milieu d'action abaisse nettement l'activité désinfectante des substances étudiées. Mais cet abaissement est loin d'être le même pour tous

les antiseptiques. Très marquée pour les corps halogénés, et particulièrement pour le brome et le chlore, cette atténuation est moins forte dans le cas du bichlorure de mercure, et encore moins dans le cas du phénol. Nous verrons plus loin que ces considérations ont une grande importance pratique au point de vue qui nous occupe ici. Elles sont en rapport direct avec la validité de l'essai, du simple fait que les quantités de substances antiseptiques transportées dans le bouillon de subculture sont atténuées à des degrés différents par l'albumine de ce milieu.

Remarquons, par ailleurs, que l'atténuation de l'activité désinfectante par l'albumine semble moins forte, vis-à-vis des bacilles diphtériques que pour les autres espèces bactériennes étudiées.

b) *La présence de chlorure de sodium* ne modifie pas d'une façon bien nette l'activité de la plupart des substances étudiées. Dans le cas du bichlorure de mercure, nous retrouvons bien l'atténuation d'activité mentionnée par certains auteurs, mais, dans le cas du phénol, nos essais ne mettent pas en évidence l'augmentation d'activité ci-dessus mentionnée, comme le montrent les valeurs données dans le tableau xxx.

(Les doses antibiotiques obtenues pour le phénol, vis-à-vis du staphylocoque, sont respectivement de 10g,3 et de 12 grammes en eau distillée et en eau physiologique.)

c) *La présence des substances contenues dans la macération de viande* diminue nettement l'activité du bichlorure de mercure et de l'iode, mais ne modifie pas l'activité du phénol, comme le montrent les valeurs données dans le tableau suivant. On y voit, côte à côte, les doses antibiotiques moyennes de ces trois corps, déterminées d'une part en eau distillée et d'autre part en macération de viande diluée, vis-à-vis de staphylocoques âgés de 24 heures.

TABLEAU XXXVI

DOSES ANTIBIOTIQUES VIS-A-VIS DU *Staphylococcus aureus*, DÉTERMINÉES
DANS DES MILIEUX DIFFÉRENTS

Désinfectants.	MILIEUX INTERMÉDIAIRES						Rapport entre les doses antibiotiques moyennes.
	Macération de viande diluée.			Eau distillée.			
	Doses extrêmes inférieures.	Doses antibiotiques moyennes.	Doses extrêmes supérieures.	Doses extrêmes inférieures.	Doses antibiotiques moyennes.	Doses extrêmes supérieures.	
Bichlorure de mercure ..	0,15	0,31	0,48	0,05	0,11	0,15	2,8
Phénol	6,25	10,15	13,75	6,75	10,3	13,75	0,98
Iode	0,08	0,11	0,18	0,009	0,013	0,017	8,4

Les doses antibiotiques de l'iode et du bichlorure de mercure sont, comme on le voit, plus élevées en présence de macération de viande qu'en eau distillée ; elles sont respectivement : 0g,11 et 0g,31 au lieu de 0g,013 et 0g,014. Le pouvoir antibiotique de ces deux substances est donc atténué par la présence des substances contenues dans la macération de viande ; il est 8,4 fois moins grand pour l'iode et 2,8 fois moins grand pour le bichlorure de mercure qu'en eau distillée.

Le phénol, au contraire, se montre très peu atténué dans son activité par les constituants de la macération de viande : les doses antibiotiques déterminées dans les deux conditions sont sensiblement identiques, ce qui est en accord avec ce que nous venons de voir au sujet de la simple présence d'albumine dans le milieu d'essai.

Afin de rendre ces constatations plus évidentes, nous avons groupé ci-dessous les courbes traduisant ces résultats (fig. 6). Pour chacune des trois substances étudiées, nous donnons simultanément la courbe représentant les résultats de déterminations en série de la dose antibiotique en eau distillée, et la courbe représentant les résultats de déterminations en série de la dose antibiotique en macération de viande diluée. Sur ces courbes sont portées en abscisses les doses antibiotiques obtenues dans les différents essais, et en ordonnées le nombre d'essais dans lesquels a été retrouvée chacune de ces doses. Les doses antibiotiques étant portées en abscisses, le décalage des courbes vers la droite correspond à une augmentation de ces doses, c'est-à-dire à une diminution du pouvoir antibiotique. Du premier coup d'œil, on constate que ce décalage est très marqué dans le cas de l'iode, encore net, bien qu'à un moindre degré, dans le cas du bichlorure de mercure, et nul dans le cas du phénol où les deux courbes se superposent.

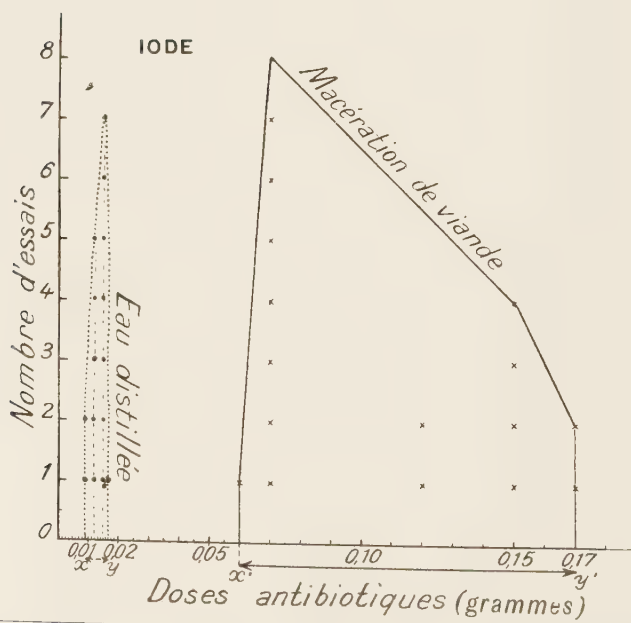
Si nous considérons les deux courbes de l'iode et du bichlorure de mercure, nous constatons, par ailleurs, que la largeur de base de ces courbes ($x-y$) s'élargit considérablement du fait de l'introduction, dans le milieu d'essai, des constituants de la macération de viande. Cet élargissement, qui traduit un plus grand écart des doses extrêmes obtenues au cours des essais, exprime donc une plus grande irrégularité des résultats obtenus. Il nous confirme la nécessité d'effectuer avant tout les déterminations antibiotiques en eau distillée et de les compléter par des essais en milieux plus complexes.

d) La présence des substances contenues dans le bouillon peptoné salé atténué, d'une façon générale, l'activité de toutes les substances étudiées, et à un degré sensiblement identique à celui de l'atténuation produite par la simple présence d'albumine dans le milieu d'action.

Il nous est donc, de ce fait, généralement impossible de comparer le pouvoir antigénétique d'une substance, lequel est obligatoirement déterminé en présence de bouillon peptoné salé, à son pouvoir antibiotique, déterminé habituellement en eau distillée. Il est, cependant, extrêmement intéressant de comparer ces deux valeurs, pouvoir antigénétique et pouvoir antibiotique.

Dans ce but, nous les avons déterminées dans un même milieu, le bouillon peptoné salé, et dans les mêmes conditions.

Le pouvoir antibiotique a donc été déterminé selon la technique habi-



tuelle, mais en prenant comme milieu d'essai le bouillon peptoné salé. Le pouvoir antigénétique a été déterminé dans son milieu habituel, le bouillon peptoné salé, mais sur une concentration en germes de 500 mil-

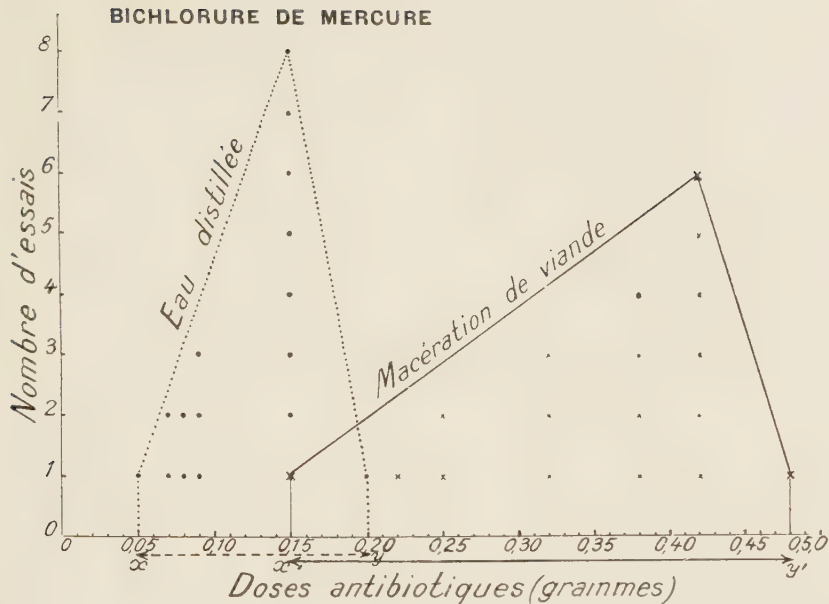


Fig. 6. — Influence, sur la détermination de la dose antibiotique, du milieu intermédiaire de l'essai. (Eau distillée, ou macération de viande.)

lions par centimètre cube (concentration utilisée pour la détermination normale du pouvoir antibiotique.)

Ces déterminations ont été effectuées avec les substances antiseptiques habituellement utilisées dans nos essais : l'eau de chlore, la liqueur de Labarraque, l'eau de brome, l'eau iodo-iodurée, le bichlorure de mercure et le phénol. Le germe utilisé pour les essais était le staphylocoque doré (souche C).

Les résultats obtenus au cours de ces essais sont donnés dans le tableau suivant :

TABLEAU XXXVII

COMPARAISON DES DOSES ANTIGÉNÉTIQUES ET DES DOSES ANTIBIOTIQUES DÉTERMINÉES DANS LES MÊMES CONDITIONS.

Germe en expérience : Staphylococcus aureus (souche C).

Milieu de l'essai : bouillon peptoné salé.

<i>Désinfectants.</i>	Doses antigénétiques pour 500 millions de germes par centimètre cube (grammes).	Doses antibiotiques en bouillon peptoné salé (grammes).
Eau de chlore (en Cl)	0,30	0,74
Liqueur de Labarraque (en Cl).....	0,67	1,25
Eau iodo-iodurée (en I)	0,80	1,35
Eau de brome (en Br)	0,70	10,9
Bichlorure de mercure	0,10	0,45
Phénol	3,6	12,5

La comparaison des valeurs données dans ce tableau permet de constater que les doses antigénétiques sont, dans les mêmes conditions, toujours inférieures aux doses antibiotiques. C'est là un fait auquel nous devons logiquement nous attendre : la quantité d'une substance antiseptique nécessaire pour tuer une quantité donnée de germes doit, évidemment, être supérieure à celle qui ne fait qu'empêcher les germes de se développer dans le même milieu.

3^o Les valeurs antibiotiques des substances étudiées sont, comme il était à prévoir, extrêmement plus faibles vis-à-vis de la *forme sporulée* en expérience, que vis-à-vis des formes végétatives (tableau xxxiv). Pour le phénol, notamment, même après un temps d'action de 12 heures, on n'arrive pas à tuer les spores de *Bacillus subtilis* avec une concentration de 15 grammes de ce corps dans un litre d'eau distillée.

D. — EXPÉRIENCES EFFECTUÉES POUR APPRÉCIER LE DEGRÉ DE LA RÉGULARITÉ DES RÉSULTATS OBTENUS

Notre désir étant, comme nous l'avons souvent dit, de trouver pour nos valeurs antimicrobiennes des chiffres ayant une valeur, en quelque sorte, absolue, il nous faut vérifier si les méthodes que nous avons décrites sont bien capables de donner des *chiffres réguliers*. Dans ce but, nous avons entrepris toute une série de déterminations des doses antibiotiques, en eau distillée, vis-à-vis du staphylocoque, de trois désinfectants que nous avons choisis comme types : le phénol, le bichlorure de mercure et l'iode.

Dans le tableau suivant sont données les valeurs obtenues au cours de ces essais. On y trouvera, pour chaque substance, la dose antibiotique obtenue dans chacune des 16 déterminations effectuées, la moyenne arithmétique de ces diverses doses, la dose antibiotique obtenue dans le plus grand nombre d'essais, et les valeurs extrêmes obtenues au cours de ces déterminations.

Ces valeurs nous ont permis d'établir des courbes qui permettent peut-être mieux de juger de la régularité des résultats obtenus. Ces courbes ont été établies en portant sur l'axe des abscisses les valeurs des diverses doses antibiotiques, et, sur l'axe des ordonnées, le nombre de fois où chacune de ces doses a été obtenue (fig. 7).

L'examen de ces courbes et des valeurs données dans le tableau xxviii permet de constater la régularité suffisante des résultats obtenus. Nous voyons, en effet, que, pour chacun des corps étudiés, la même valeur a été obtenue dans 7 essais, au moins, sur 16. D'autre part, les doses les plus faibles et les plus fortes doses obtenues ne présentent entre elles qu'un écart de 1 à 2 pour le phénol et pour l'iode, et de 1 à 3 pour le bichlorure de mercure, corps qui est, comme nous le savons, un antiseptique très irrégulier.

Si nous prenons maintenant, comme on doit le faire pour chaque méthode de mesure biologique que l'on propose, le pourcentage des écarts entre la dose moyenne et les doses extrêmes, nous obtenons, si nous exceptons l'écart en moins trouvé pour le sublimé, (qui est de 50 p. 100

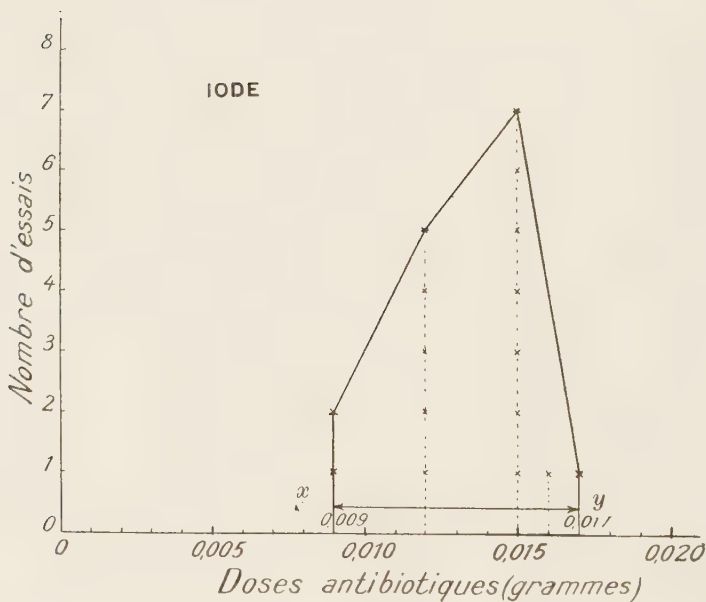
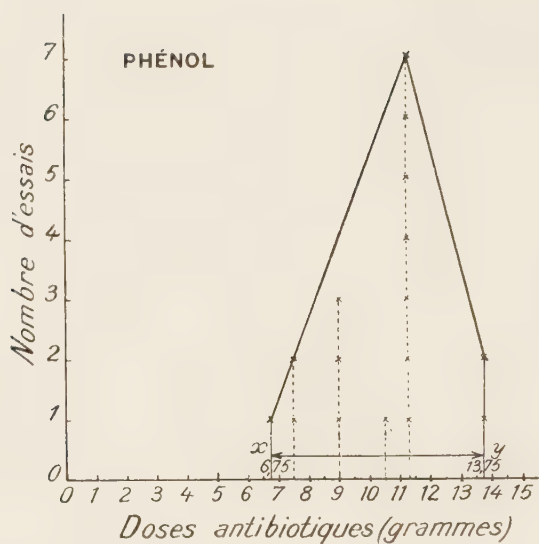
environ), des écarts qui sont tous de l'ordre de 30 p. 100. Nous pouvons considérer cette limite d'erreur, voisine de 30 p. 100, comme tout à fait satisfaisante ; elle est de l'ordre des limites d'erreurs des meilleures méthodes de mesures pharmacologiques, et elle est d'autant plus satisfaisante qu'elle porte sur des organismes qui présentent, vis-à-vis des substances toxiques, une variation de résistance beaucoup plus considérable que les animaux supérieurs habituellement utilisés pour les essais de toxicité. Nous considérons donc notre méthode comme donnant des résultats suffisamment réguliers, et notre dose moyenne comme représentant une véritable valeur absolue, dans les conditions de l'essai.

TABLEAU XXXVIII

Valeurs des doses antibiotiques en eau distillée, vis-à-vis de staphylocoques dorés âgés de 24 heures et cultivés sur bouillon gélosé.

(Technique directe.)

Essais n ^{os}	Désinfectants.		
	Phénol. Doses antibiotiques (grammes).	Bichlorure de mercure. Doses antibiotiques (grammes).	Iode. Doses antibiotiques (grammes).
1	9,0	0,15	0,012
2	6,75	0,08	0,009
3	11,25	0,07	0,012
4	11,25	0,09	0,015
5	13,75	0,05	0,017
6	9,0	0,09	0,015
7	11,25	0,15	0,015
8	7,5	0,15	0,012
9	11,25	0,15	0,015
10	9,0	0,08	0,012
11	7,5	0,15	0,016
12	13,75	0,15	0,015
13	11,25	0,09	0,012
14	9,75	0,07	0,015
15	11,25	0,15	0,009
16	11,25	0,15	0,015
Dose moyenne (m o y. arithmétique).	10,48	0,11	0,013
Dose obtenue dans le plus grand nombre d'essais..	11,25	0,15	0,015
Valeurs extrêmes obtenues.	6,75 et 13,75	0,05 et 0,15	0,009 et 0,017
Rapport entre les doses extrêmes.	1/2	1/3	1/2
Écart entre la dose moyenne et les doses extrêmes, en %.	En plus : 31 %	En plus : 36 %	En plus : 30 %
	En moins : 35 %	En moins : 54 %	En moins : 30 %



E. — ÉVALUATION DE LA VALIDITÉ DE L'ESSAI ANTIBIOTIQUE PAR LA TECHNIQUE DIRECTE

Nous venons de voir que la méthode proposée donnait des résultats d'une régularité satisfaisante. Il nous faut, maintenant, examiner si

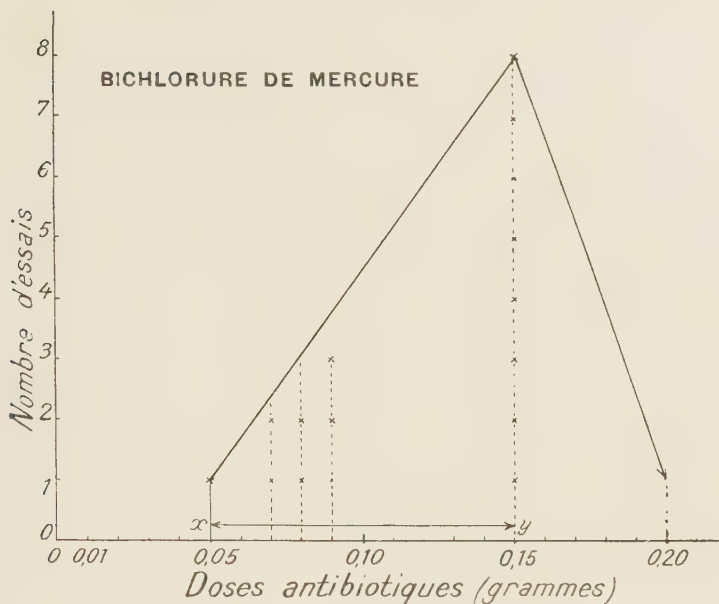


Fig. 7. — Doses antibiotiques, en eau distillée, vis-à-vis du staphylocoque. Essais en série. (Technique directe.)

l'erreur possible, que nous avons longuement étudiée ci-dessus, due au fait que l'on transporte, dans le milieu de subculture, une petite quantité d'antiseptique, ne laisse pas persister un doute sur la *validité* de ces résultats.

Pour ceci, nous nous bornerons à rapprocher de la dose antigénétique la quantité d'antiseptique transportée dans le milieu de subculture dans chacun des essais. Nous savons que toutes les conditions ont été remplies pour que ce rapprochement soit parfaitement légitime.

Considérons un *essai antibiotique typique*:

Dans chaque tube en série, nous avons un volume total de 5 centimètres cubes contenant 500 millions de germes par centimètre cube et des quantités croissantes de la solution de l'antiseptique à l'étude. Dans chacun de ces tubes, après un contact de 15 minutes entre l'antiseptique et les germes, nous prélevons 1/10 de centimètre cube contenant 50 millions de germes et nous l'ensemencions dans 5 centimètres cubes de bouillon de subculture. Nous avons donc finalement, exactement comme dans le cas de l'essai antigénétique, une série de tubes de bouillon contenant 10 millions de germes par centimètre cube, bouillon que nous mettons à l'étuve à 37°.

Après un temps d'incubation suffisant, certains de ces tubes présentent une multiplication microbienne, les autres restant stériles.

Considérons le premier tube de la série resté stérile. Ce tube correspond au prélèvement effectué dans le tube en série qui contenait la dose anti-

biotique de la substance pour 5 centimètres cubes de milieu d'essai. Cette dose, multipliée par 200, donne donc la dose antibiotique, telle que nous l'entendons, c'est-à-dire rapportée au litre (D. ab.).

Nous avons, d'autre part, transporté dans les 5 centimètres cubes de milieu de subculture 1/10 de centimètre cube du milieu d'essai. La quantité du milieu d'essai transportée par litre de bouillon de subculture est donc $(0,10 \times 200) = 20$ centimètres cubes. Comme nous avons, par définition, à ce moment, par litre de milieu d'essai, la dose antibiotique de la substance (D. ab.), la quantité transportée par litre de subculture est donc de :

$$\left(\frac{\text{D. ab.} \times 20}{1\ 000} \right) \quad \left(\frac{\text{D. ab.}}{50} \right) = (\text{Q. t.}).$$

Il nous suffit donc de diviser par 50 la dose antibiotique d'une substance pour connaître la quantité de cette substance transportée par litre de bouillon de subculture.

Il ne restera plus qu'à *comparer ce chiffre* $\left(\frac{\text{D. ab.}}{50} \right)$ ou (Q. t.) à la dose *antigénétique* de la substance, pour voir à quel degré l'essai peut être considéré comme valable.

L'essai est évidemment d'autant plus valable que la quantité d'antiseptique transportée dans les subcultures est plus éloignée de la dose *antigénétique* du produit, c'est-à-dire que le rapport $\left(\frac{\text{Q. t.}}{\text{D. ag.}} \right)$ est plus petit.

Nous donnons dans le tableau suivant les résultats obtenus en effectuant ce calcul pour chacun des corps que nous avons étudiés.

TABLEAU XXXIX

Germe en expérience : staphylocoque doré.

<i>Désinfectants.</i>	Doses antibiotiques (eau distillée)	Quantités transportées par litre de subculture	Doses antigénétiques	Valeurs du rapport
	D. ab.) (grammes).	(Q. t.) = $\frac{\text{D. ab.}}{50}$ (grammes).	(D. ag.) (grammes).	$\left(\frac{\text{Q. t.}}{\text{D. ag.}} \right)$ (grammes).
Eau de chlore (en Cl)....	0,006	0,00012	0,260	1/2166
Eau de Brome (en Br) ...	0,046	0,00092	0,680	1/739
Eau iodo-iodurée (en I)...	0,013	0,00026	0,400	1/1538
Bichlorure de mercure	0,11	0,0022	0,07	1/32
Phénol	10,3	0,206	2,6	1/13

Nous voyons très nettement, dans ce tableau, que la validité des résultats obtenus avec le chlore, avec le brome et avec l'iode, est indiscutable, puisque la quantité de ces substances transportée dans les subcultures,

est de l'ordre du 1/1.000 de la dose antigénétique. Cette quantité, extrêmement restreinte, est totalement incapable de gêner la multiplication des bactéries en expérience. Pour le bichlorure de mercure, notre certitude est moins grande, mais nous pouvons cependant supposer que les résultats de l'essai sont valables, puisque la quantité transportée dans les subcultures n'est encore que le 1/30 de la dose antigénétique. Pour le phénol, au contraire, il nous est difficile d'admettre sans discussion la validité de l'essai. En effet, la quantité de phénol transportée dans la subculture est voisine du 1/10 de la dose antigénétique, et l'on peut supposer qu'elle peut gêner le développement de bactéries dont la vitalité a été affaiblie par le contact préalable avec le désinfectant. C'est donc dans le cas du phénol que nous constatons la gêne maxima. Or, c'est précisément pour ce corps et pour les substances voisines que les auteurs américains et anglais ont cru pouvoir négliger la cause d'erreur en question. Sans d'ailleurs insister sur ce sujet, certains de ces auteurs ont mentionné que la cause d'erreur envisagée ne pouvait être bien importante pour les corps phénoliques, puisqu'elle était due à l'action antigénétique, et que la valeur antigénétique de ces corps était, de notion courante, très réduite. Mais, comme nous l'avons déjà dit, ces auteurs semblent avoir oublié que le phénol est, relativement, encore moins antibiotique (en eau distillée), qu'il n'est antigénétique ; par suite, on est dans l'obligation, au cours de l'essai antibiotique, d'atteindre des concentrations de phénol très fortes, et, de ce fait, on transporte dans les subcultures une quantité très voisine de la dose antigénétique. Il nous est facile de mettre ceci plus nettement en évidence :

Revenons aux considérations que nous avons énoncées précédemment :

c'est le rapport $\left(\frac{Q. t.}{D. ag.} \right)$ qui sert de base à nos calculs. Or, comme nous

l'avons dit $(Q. t.) = \frac{D. ab.}{50}$; il en résulte que c'est le rapport

$\left(\frac{D. ab.}{D. ag.} \right) \times \frac{1}{50}$ qui est finalement à la base de nos considérations. Plus la valeur de ce rapport est petite, plus le résultat considéré risque d'être valable. Par suite, s'il est exact que la valeur antigénétique joue un rôle important dans l'erreur en cause, puisque ses variations sont multipliées par 50, la valeur antibiotique joue, elle aussi, un rôle, plus petit, mais net. Nous pouvons dire que :

Plus la dose antibiotique est faible, plus la valeur du rapport est petite ;

Plus la dose antibiotique est forte, plus la valeur du rapport est grande ;

Plus la dose antigénétique est forte, plus la valeur du rapport est petite ;

Plus la dose antigénétique est faible, plus la valeur du rapport est grande.

Par suite :

Pour les corps très antibiotiques, la dose antibiotique est faible et l'essai est favorable ;

Pour les corps peu antibiotiques, la dose antibiotique est forte et l'essai est défavorable ;

Pour les corps très antigénétiques, la dose antigénétique est faible et l'essai est défavorable ;

Pour les corps peu antigénétiques, la dose antigénétique est forte et l'essai est favorable.

Comme nous sommes dans l'obligation de *tenir compte des deux termes du rapport*, nous pouvons formuler la règle suivante :

Les résultats les plus valables sont obtenus avec les substances très antibiotiques et très peu antigénétiques.

En somme, toutes ces considérations roulent sur les variations *relatives* des deux pouvoirs antibiotique et antigénétique. Est-il possible de prévoir à l'avance l'un ou l'autre ? Considérons le tableau suivant qui a été établi dans des conditions absolument identiques pour la mesure des deux pouvoirs. C'est-à-dire que la dose antigénétique a été déterminée sur une concentration en germes de 500 millions par centimètre cube, au lieu de la concentration habituelle de 10 millions par centimètre cube, et, de son côté, la dose antibiotique a été déterminée dans le milieu même (bouillon), qui sert à la détermination de la dose antigénétique.

TABLEAU XL

COMPARAISON DES DOSES ANTIGÉNÉTIQUES ET ANTIBIOTIQUES DÉTERMINÉES DANS LES MÊMES CONDITIONS, VIS-A-VIS DU STAPHYLOCOQUE DORÉ

<i>Désinfectants.</i>	Doses antigénétiques (en bouillon) avec 500 millions de germes par cent. cube (grammes).	Doses antibiotiques (en bouillon) (milieu albumineux) (grammes).	Valeur du rapport $\left(\frac{D. ag.}{D. ab.}\right)$
Eau de chlore (en Cl)	0,3	1,3	1/4,3 = 0,23
Eau de brome (en Br)	0,7	10,9	1/15 = 0,06
Eau iodo-iodurée (en I).....	0,8	1,35	1/1,6 = 0,62
HgCl ²	0,10	0,45	1/4,5 = 0,22
Phénol.....	3,6	12,5	1/3,4 = 0,29

Nous constatons, dans ce tableau, en dehors des faits déjà signalés, que la dose antigénétique est toujours, ce qui est logique, plus faible que la dose antibiotique en bouillon, et, d'autre part, qu'il n'existe pas de proportionnalité régulière entre ces deux valeurs. Il nous est donc totalement impossible, même dans des conditions absolument comparables, de dire qu'un corps très antibiotique sera très antigénétique, ou inversement. Cependant, tout au moins pour les corps étudiés, la valeur du rapport $\left(\frac{D. ag.}{D. ab.}\right)$ reste toujours du même ordre (elle va, dans les exemples cités, de 0,06 à 0,62).

Mais il faut bien noter que les valeurs données dans ce tableau ont été déterminées dans des conditions absolument identiques. Or, le véritable essai antibiotique est fait en eau distillée, ou dans une solution saline simple, seul moyen de connaître l'action désinfectante pure de la substance étudiée. Quant à l'essai antigénétique, il est inévitablement effectué dans un milieu albumineux (bouillon de culture). Le rapport des doses antigénétiques aux doses antibiotiques varie donc dans des proportions encore beaucoup plus grandes lorsque ces doses sont déterminées chacune dans les conditions normales précédemment décrites. L'examen du tableau xli permet, d'ailleurs, de le constater facilement :

TABLEAU XLI

COMPARAISON DES DOSES ANTIGÉNÉTIQUES ET ANTIBIOTIQUES DÉTERMINÉES DANS LES CONDITIONS NORMALES, VIS-A-VIS DU STAPHYLOCOQUE DORÉ

<i>Désinfectants :</i>	Doses antigénétiques en bouillon. (D. ag.) (grammes).	Doses antibiotiques en eau distillée (D. ab.) (grammes).	Valeur du rapport $\left(\frac{D. ag.}{D. ab.}\right)$
Eau de chlore (en Cl)	0,26	0,006	1/0,023 = 43,4
Eau de brome (en Br)	0,68	0,046	1/0,071 = 14,08
Eau iodo-iodurée (en I)	0,40	0,013	1/0,027 = 37,03
HgCl ²	0,07	0,11	1/1,58 = 0,63
Phénol.....	2,6	10,3	1/4 = 0,25

Ainsi, le rapport des doses antigénétiques aux doses antibiotiques, déterminées dans les conditions normales, varie, pour les corps étudiés, de 0,25 à 43, soit de 1 à 172.

Si nous rapprochons les valeurs données dans les deux derniers tableaux, nous constatons de nouveau que le bichlorure de mercure et le phénol sont beaucoup moins atténués par l'albumine, dans leur action, que les substances halogénées, ce que nous avons déjà noté dans le tableau xxxv. En effet, pour les substances halogénées, le rapport de la dose antigénétique à la dose antibiotique est plus grand que 1 lorsque la dose antibiotique est déterminée en absence d'albumine, et plus petit que 1 lorsque cette dose est déterminée en présence d'albumine. Pour le bichlorure de mercure et surtout pour le phénol, au contraire, ce rapport reste plus petit que 1, que la dose antibiotique soit déterminée en présence ou en absence d'albumine, ses variations étant beaucoup moins intenses.

Il en résulte donc que, d'une façon générale, les résultats les moins valables seront obtenus pour les corps dont l'activité est peu diminuée par la présence d'albumine.

En résumé, la discussion précédente nous permet de formuler de la façon suivante les prévisions relatives à la validité de l'essai antibiotique selon la technique « directe » :

TABLEAU XLII

Substances très antibiotiques (en eau distillée).	Substances relativement <i>peu</i> anti- génétiques (atténuation nette par l'albumine) : (par exemple: chlore-iode-brome).	Prévision de la gène apportée. Nulle.
	Substances relativement <i>très</i> anti- génétiques (faible atténuation par l'albumine) : (par exemple : bichlorure de mercure).	Très improbable.
Substances peu antibiotiques (en eau distillée).	Substances relativement <i>peu</i> anti- génétiques.	Improbable.
	Substances relativement <i>assez</i> antigénétiques (très faible atté- nuation par l'albumine) : (par exemple : phénol).	Possible.
	Substances relativement <i>très</i> an- tigénétiques.	Probable.

De ces diverses considérations, il ressort que, si la première technique de détermination de la valeur antibiotique, que nous venons d'exposer, est tout à fait valable pour l'essai des substances halogénées, et même très acceptable pour l'essai de substances telles que le bichlorure de mercure, elle est sujette à discussion pour l'essai des substances phénoliques. Pour ces dernières, il nous a donc fallu mettre au point une deuxième technique, dans laquelle nous cherchons non plus seulement à évaluer, mais à éliminer la cause d'erreur en question.

Nous allons maintenant examiner cette deuxième technique.

IV. — MÉTHODE DE DÉTERMINATION DE LA VALEUR ANTIBIOTIQUE COMPORTANT L'UTILISATION DES TECHNIQUES DE CENTRIFUGATION

A. — EXPOSÉ DE LA TECHNIQUE

Utilisant les données que nous avons acquises au cours de l'expérimentation (données exposées au cours de notre deuxième chapitre), nous avons amélioré notre première technique d'essai des valeurs antibiotiques, en y adjoignant une manipulation supplémentaire. Nous avons ainsi mis au point une deuxième technique de détermination des valeurs antibiotiques que nous appellerons « technique par centrifugation ». Cette deuxième technique est établie sur les mêmes bases que

la précédente et elle n'en diffère que par le point suivant : après action de l'antiseptique, les germes traités, au lieu d'être directement réensemencés dans un milieu de subculture, sont séparés du milieu d'essai par centrifugation. On les lave ensuite plusieurs fois à l'eau distillée stérile en les séparant chaque fois par centrifugation, et on les introduit finalement dans le milieu de subculture.

Nous ne décrirons pas ici la technique détaillée de cette deuxième méthode; elle ne diffère en rien de la « technique directe », précédemment décrite, pour tout ce qui concerne les premiers temps de l'essai, à savoir :

- 1^o La préparation des solutions désinfectantes ;
- 2^o La préparation des germes pour l'essai. La préparation des suspensions microbiennes et la numération des germes dans ces suspensions ;
- 3^o La préparation des milieux de culture et de subculture ;
- 4^o La préparation des milieux où se fait le contact de l'antiseptique et des germes.

Les seules modifications apportées à la méthode directe, en dehors des manipulations de centrifugation, sont les suivantes :

a) Le *temps de contact* entre les germes et la substance désinfectante est encore maintenu à *15 minutes* dans le cas des formes végétatives. Mais il importe ici de bien préciser ce que l'on entend au juste par « temps de contact ». En effet, des essais préliminaires nous ont permis de constater que, tout au moins pour les antiseptiques étudiés, l'action du désinfectant se poursuivait pendant la centrifugation effectuée pour séparer les germes de la solution antiseptique. Dans le temps de 15 minutes habituellement adopté pour nos essais, il convient donc de faire entrer ce temps nécessaire pour effectuer cette première centrifugation. Or, pour assurer une centrifugation complète, assurant l'entraînement de la totalité des germes en suspension, il faut un temps minimum de 10 minutes (en utilisant une centrifugeuse à grande vitesse).

Nous avons ainsi été amenée à adopter, pour les essais par centrifugation, les conditions de temps suivantes :

La solution antiseptique et la suspension microbienne sont mélangées et laissées en repos pendant 5 minutes, puis l'on effectue une centrifugation d'une durée totale de 10 minutes, afin d'isoler les germes. Le contact total de l'antiseptique et des germes est donc de 15 minutes. On enlève ensuite, par décantation, le liquide qui recouvre le culot microbien et on effectue alors plusieurs lavages des germes isolés, en les mettant en suspension dans de l'eau distillée stérile et en les séparant chaque fois par centrifugation. Pour les centrifugations destinées au lavage des germes, afin d'éviter la rupture des tubes, nous n'avons pas poussé la vitesse de centrifugation aussi loin que dans la première centrifugation ; par contre, comme, à ce moment, le facteur temps n'entre théoriquement pas en jeu, nous avons prolongé jusqu'à 30 minutes la durée de chacune de ces centrifugations.

Notons que le contact du désinfectant et des germes est, ici, effectué directement dans les tubes à centrifuger. Dans les cas où la centrifugeuse ne comporte que quatre godets (modèle courant des laboratoires), il convient donc de fractionner les essais en resserrant chaque fois les doses de substance antiseptique en expérience.

Remarquons encore que, dans la première technique, les germes étaient, aussitôt après action de l'antiseptique (durant 15 minutes), introduits dans le bouillon de subculture. Ici, après les 15 minutes de contact avec le désinfectant (temps comprenant la première centrifugation), les germes subissent encore deux lavages par centrifugation, avant d'être repiqués en bouillon. Nous verrons plus loin que cette différence est importante, puisque, pour certaines substances, telles que le bichlorure de mercure, ces lavages à l'eau semblent insuffisants pour arrêter l'action antiseptique.

b) La deuxième modification apportée à la méthode directe réside dans la modification du *nombre des germes repiqués* dans les subcultures. L'essai par centrifugation permettant l'élimination totale de la substance antiseptique après son contact avec les germes, il devient inutile de diminuer le plus possible la quantité du mélange (solution antiseptique — suspension microbienne) transportée dans les subcultures. Il n'est même plus nécessaire de réaliser dans les subcultures des conditions identiques à celles de l'essai antigénétique, puisque le calcul du degré de validité de l'essai devient inutile. Rien ne nous empêche donc, dans la méthode présente, de transporter, dans les milieux de subculture, la totalité des germes qui ont été soumis à l'action antiseptique, opération qui doit nous assurer, comme nous l'avons dit, le maximum de sécurité.

Ces points étant établis, nous pouvons maintenant décrire la marche globale de l'essai :

Marche de l'essai. — Les solutions désinfectantes et une suspension microbienne de titre connu ayant été préparées, on dispose 4 tubes à centrifuger, stérilisés, bouchés au coton. On introduit dans chacun, à l'aide de pipettes stériles, les quantités préalablement calculées, d'eau distillée (par exemple), de solution désinfectante, et, après mélange, de suspension microbienne, nécessaires pour obtenir un volume total de 5 centimètres cubes et une concentration en germes de 500 millions par centimètre cube. On agite le mélange avec précaution, afin de bien répartir les germes ; on remplace, avec toutes les précautions usuelles d'asepsie, les bouchons de coton par des capuchons d'aluminium stérilisés, puis on laisse en repos. Cinq minutes exactement après addition des germes dans le dernier tube, on procède à une première centrifugation d'une durée totale de 10 minutes exactement. Les germes doivent alors être nettement séparés et le liquide surnageant doit être limpide. Ce liquide est alors décanté et remplacé par 10 centimètres cubes d'eau distillée stérile, dans laquelle les germes sont mis en suspension. On les sépare alors de nouveau par centrifugation (durant une demi-heure), puis on remet le culot en suspension dans 10 centimètres cubes d'eau distillée stérile, on centrifuge de nouveau (durant une demi-heure) et on recommence une autre fois cette opération. Sur les germes isolés par cette dernière centrifugation et débarrassés du désinfectant, on ajoute alors 5 centimètres cubes de bouillon de subculture, puis on porte les tubes à 37° où on les laisse séjourner pendant au moins 4 jours avant de noter les résultats.

La concentration des germes dans les subcultures étant très forte, il faut bien veiller à ne pas considérer comme des cultures positives les bouillons de subculture dans lesquels les germes morts sont encore en suspension. Afin d'éviter toute erreur d'interprétation, il convient d'effectuer pour chaque bouillon de subculture, que l'on croit avoir cultivé, un repiquage ultérieur sur gélose inclinée.

Il est bien évident que ce mode opératoire est beaucoup plus délicat que celui qui est utilisé dans la méthode précédente. Il faut une certaine habitude de cette technique pour la mener à bien ; il faut, notamment, prendre de grandes précautions d'asepsie et de stérilisation pour éviter l'introduction dans les cultures des germes de l'air (1).

Nous donnons ci-dessous, à titre d'exemple, un *essai de détermination de la valeur antibiotique de l'iode, en eau distillée, vis-à-vis du staphylocoque*, selon la méthode par centrifugation.

Les quantités suivantes de solution iodo-iodurée, d'eau distillée, et de suspension microbienne sont introduites dans les quatre tubes à centrifuger :

TABLEAU XLIII

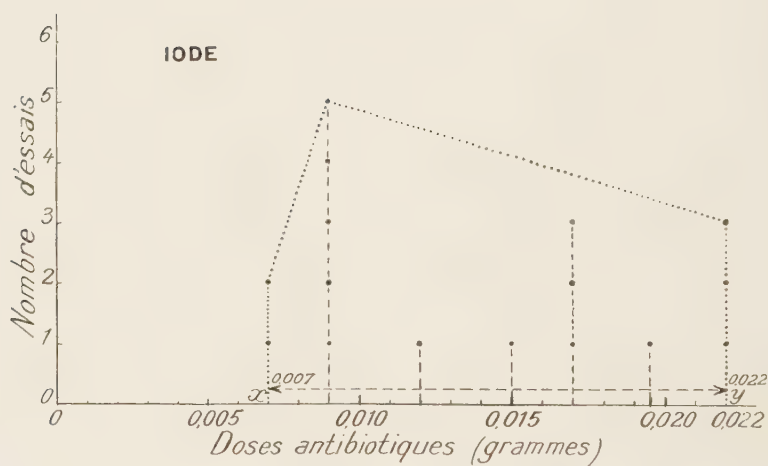
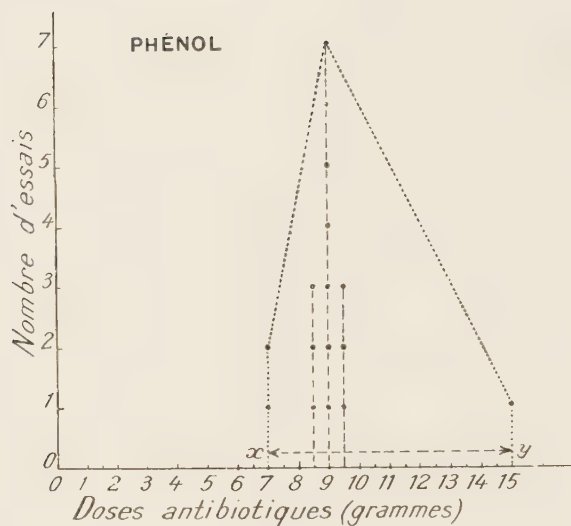
<i>Tubes :</i>	N° 1	N° 2	N° 3	N° 4
	— cm ³	— cm ³	— cm ³	— cm ³
Solution d'iode à 1/4 000	0,35	0,40	0,45	0,50
Eau distillée	3,65	3,60	3,55	3,50
Suspension microbienne	1	1	1	1
Volume total	5	5	5	5
Résultats des subcultures	+	0	0	0

La suspension microbienne utilisée dans cet essai contenait 2 500 millions de germes par centimètre cube. Ces 2 500 millions de germes introduits dans 5 centimètres cubes de milieu assurent donc une concentration en germes de 500 millions par centimètre cube.

Dans l'essai ci-dessus, la quantité de solution iodo-iodurée ayant suffi à tuer en 15 minutes, dans 5 centimètres cubes d'eau distillée, 500 millions de staphylocoques par centimètre cube, est donc comprise entre 0^{cc},35 et 0^{cc},40. La dose antibiotique de l'iode déterminée dans cet essai est donc comprise entre :

$$0,35 \times 200 \times \frac{1}{4\ 000} = 0^{\circ},017, \text{ et } 0,40 \times 200 \times \frac{1}{4\ 000} = 0^{\circ},020.$$

(1) Les tubes à centrifuger sont bouchés au coton et stérilisés au four Pasteur pendant 30 minutes à 170°. Pendant la centrifugation, ils sont hermétiquement bouchés à l'aide de capuchons en aluminium qui se vissent à leur ouverture. Ces capuchons ont été stérilisés, à part, au four Pasteur, après avoir été flambés à l'alcool. Pendant la centrifugation, pour éviter le contact du verre avec le métal, une solution saturée de borax est interposée entre les tubes à centrifuger et les godets de la centrifugeuse.



B. — EXPÉRIENCES EFFECTUÉES POUR APPRÉCIER LE DEGRÉ DE RÉGULARITÉ DES RÉSULTATS OBTENUS.

Cette technique, qui ne présente vraiment plus de graves causes d'erreur, permet-elle d'obtenir des résultats réguliers ?

Pour nous en assurer, nous avons effectué, comme avec la technique

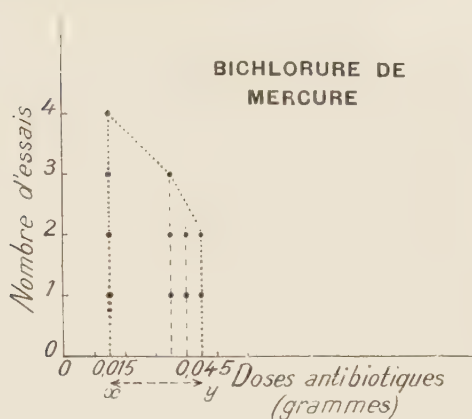


Fig. 8. — Doses antibiotiques, en eau distillée, vis-à-vis du staphylocoque. Essais en série. (Technique par centrifugation.)

précédente, des essais en série, sur les trois antiseptiques choisis comme types au cours de nos essais : iode, sublimé et phénol.

Nous avons déterminé, pour chacun de ces corps, sa dose antibiotique en eau distillée vis-à-vis du staphylocoque doré, en utilisant la technique par centrifugation.

Les solutions désinfectantes utilisées pour ces essais présentaient les titres suivants :

Solution aqueuse d'iode contenant 1 p. 100 d'iode et 2 p. 100 d'iodure de potassium ; solution aqueuse de sublimé à 1 p. 1 000 ; solution aqueuse de phénol à 5 p. 100.

Nous donnons ci-dessous les valeurs obtenues au cours de ces essais, ainsi que les courbes obtenues en portant sur l'axe des abscisses les valeurs des doses antibiotiques et sur l'axe des ordonnées les nombres des essais dans lesquels chacune de ces valeurs a été retrouvée (fig. 8).

Dans le tableau suivant, on trouvera, pour chaque substance, la dose antibiotique obtenue dans chacune des déterminations effectuées, la moyenne arithmétique de ces diverses doses, la dose antibiotique obtenue dans le plus grand nombre d'essais, et les valeurs extrêmes obtenues au cours de ces déterminations.

L'examen des valeurs données dans ce tableau et des courbes qu'elles nous ont permis d'établir montre que la régularité des résultats peut, dans l'ensemble, être considérée comme suffisante. Pour le phénol, la même valeur a été retrouvée 7 fois sur 16 ; pour l'iode, 5 fois sur 16, et, pour le bichlorure de mercure, 4 fois sur 11. Quant à l'écart entre les doses extrêmes obtenues, il est de 1 à 2 dans le cas du phénol, de 1 à 2.7 dans le cas de l'iode et de 1 à 3 dans le cas du bichlorure de mercure.

TABLEAU LXIV

Valeurs obtenues comme doses antibiotiques, vis-à-vis de *staphylocoques dorés* (souche C) âgés de **24 heures** et cultivés sur bouillon gélosé.

Milieu, intermédiaire: eau distillée.

(Technique par centrifugation.)

Essais n°	Désinfectants.		
	Phénol. Doses antibiotiques (grammes).	Bichlorure de mercure. Doses antibiotiques (grammes).	Iode. Doses antibiotiques (grammes).
1	9,0	0,035	0,015
2	15,0	0,015	0,017
3	9,5	0,035	0,017
4	8,5	0,045	0,009
5	9,0	0,015	0,017
6	9,0	0,040	0,009
7	7,0	0,035	0,022
8	8,5	0,045	0,009
9	9,0	0,015	0,007
10	8,5	0,040	0,012
11	9,5	0,015	0,009
12	9,0	—	0,022
13	9,0	—	0,009
14	7,0	—	0,007
15	9,5	—	0,022
16	9,0	—	0,020
Dose moyenne (moy. arithmétique).	9,12	0,030	0,013
Dose obtenue dans le plus grand nombre d'essais.	9,00	0,015	0,009
Valeurs extrêmes obtenues.	7,0 à 15,0	0,015 à 0,045	0,008 à 0,022
Rapport entre les doses extrêmes.	1/2	1/3	1/2,7
Écart entre la dose moyenne et les doses extrêmes en %.	En plus : 64 % En moins : 23 %	En plus : 56 % En moins : 50 %	En plus : 69 % En moins : 38 %

Enfin, le pourcentage des écarts entre la dose moyenne et les doses extrêmes est, en moyenne, de 60 p. 100 en plus et de 40 p. 100 en moins. Les erreurs possibles sont donc, ici, un peu plus fortes que dans la première technique, ce qui ne saurait nous étonner, si nous considérons les difficultés techniques de réalisations de ce deuxième procédé, et la complexité des manipulations nécessaires.

V. — COMPARAISON DES RÉSULTATS OBTENUS AVEC LA TECHNIQUE " DIRECTE " ET AVEC LA TECHNIQUE PAR CENTRIFUGATION

Afin de faciliter la comparaison des résultats obtenus avec les deux techniques décrites, nous avons porté simultanément sur un même graphique les courbes représentant les résultats des déterminations des valeurs antibiotiques du bichlorure de mercure, du phénol et de l'iode, effectuées par les deux procédés. (fig. 9) (Rappelons que ces valeurs ont été données dans les tableaux xxxviii et xliv.)

1^o Dans le cas du phénol, les valeurs antibiotiques moyennes trouvées avec les deux techniques sont sensiblement identiques. Si la quantité de phénol transportée dans les subcultures, au cours de l'essai par la technique directe, suffisait à fausser les résultats de l'essai, nous aurions trouvé, avec la technique par centrifugation, une dose antibiotique plus forte pour le phénol. Puisqu'il n'en est rien, c'est que la valeur trouvée par la technique directe était bien exacte. La validité des résultats obtenus par la première technique se trouve donc confirmée, même dans le cas du phénol, fait sur lequel nous avons précédemment jugé prudent d'émettre quelque doute.

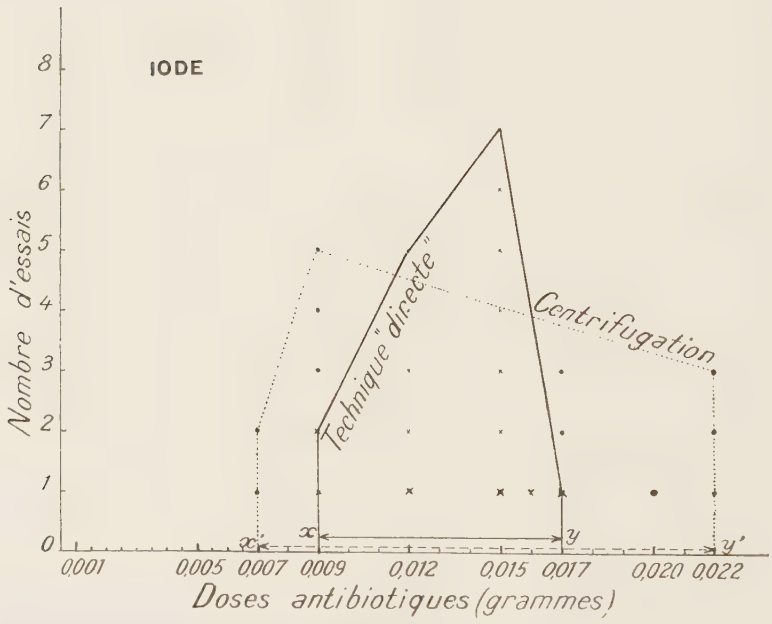
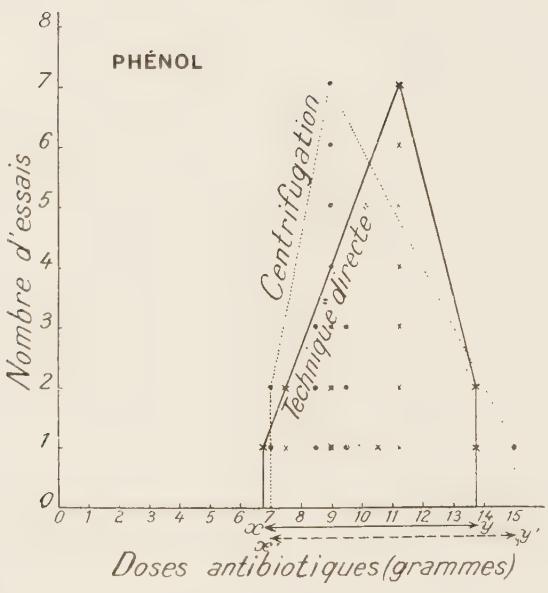
2^o Dans le cas de l'iode, les résultats sont, comme nous nous y attendions, d'une constance remarquable, puisque la dose antibiotique moyenne obtenue pour ce corps est, dans les deux cas, 0^g,013 ;

3^o Dans le cas du bichlorure de mercure, nous retrouvons, avec la deuxième technique, l'irrégularité des résultats déjà mentionnée. On constate, une fois de plus, à quel point l'action antibiotique du bichlorure de mercure est sensible aux modifications des conditions expérimentales. Nous obtenons, avec la deuxième technique, une dose antibiotique plus faible qu'avec la première. A quoi peut-on attribuer cette divergence dans les résultats ?

Si l'on devait l'attribuer au transport de bichlorure de mercure dans les subcultures, au cours de la technique directe, transport entraînant une erreur d'interprétation, les valeurs trouvées avec la technique par centrifugation seraient plus grandes.

Si la divergence provenait du nombre différent de germes repiqués, qui, comme nous l'avons vu, importe beaucoup pour le bichlorure de mercure, le chiffre trouvé par centrifugation serait encore plus grand.

C'est donc ailleurs qu'il faut en chercher l'explication. De ce fait, une seule interprétation semble possible. Alors que l'action de l'iode ou du phénol en excès est arrêtée, après le temps fixé (15 minutes), aussi bien par le repiquage des germes en bouillon albumineux (technique directe) que par le lavage à l'eau (technique par centrifugation), il ne



semble pas en être de même pour le bichlorure de mercure. Ce dernier corps est, vraisemblablement, retenu par les constituants cellulaires des bactéries, d'une façon plus solide que les précédents. Il en résulte que les lavages à l'eau ne suffisent pas pour entraîner le désinfectant, et que le

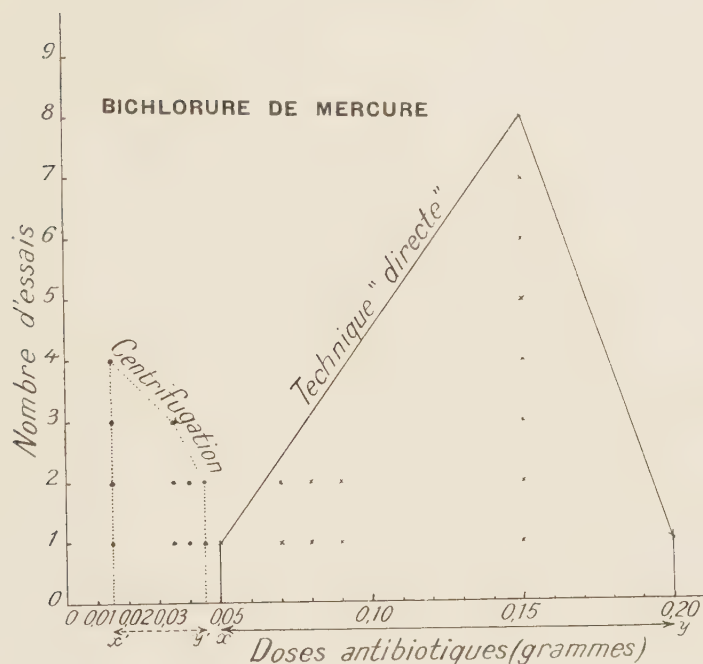


Fig. 9. — Comparaison des résultats obtenus avec la technique directe et avec la technique par centrifugation.

temps réel de contact n'est plus de 15 minutes, mais se trouve prolongé à une durée mal définie. Cette explication concorde d'ailleurs avec certains résultats trouvés, notamment, par les auteurs qui, utilisant les techniques des porte-germes, jugeaient nécessaires, pour arrêter l'action du bichlorure de mercure, d'utiliser non pas de simples lavages à l'eau, mais d'effectuer une véritable neutralisation chimique (sulfures).

Quoi qu'il en soit, de la comparaison des résultats donnés par les deux techniques, nous pouvons conclure :

1^o Que pour les corps tels que l'iode, le bichlorure de mercure, et même le phénol, la cause d'erreur inhérente à notre première technique, à savoir l'action antigénétique du désinfectant transporté dans les subcultures, ne se fait pas sentir. Nous voyons, notamment pour le phénol, qu'il suffit que la dose de désinfectant transportée dans la subculture soit sensiblement 10 fois plus faible que la dose antigénétique pour ne pas fausser les résultats de l'essai.

De ce fait, nous pensons que notre première technique peut être considérée comme ayant une valeur générale, et peut être appliquée à la grande majorité des substances douées de propriétés antiseptiques réelles.

Il peut cependant exister, comme nous l'avons déjà dit, et comme le montrent des travaux en cours au laboratoire, certains corps chimiques,

au reste peu antiseptiques, pour lesquels il est nécessaire d'utiliser la seconde technique.

2° Si les valeurs antibiotiques obtenues pour l'iode et pour le phénol sont les mêmes par l'une ou l'autre technique, il n'en est pas de même pour le bichlorure de mercure. Ce fait tient, comme nous l'avons vu, à la modification du temps de contact réel du désinfectant avec les germes, modification due à l'opération même des lavages par centrifugation, et qui crée un facteur d'incertitude. Peut-être serait-il possible d'atténuer cette cause d'erreur en diminuant la durée des centrifugations ou en augmentant leur vitesse ; mais ceci représenterait une nouvelle difficulté technique difficilement surmontable. Peut-être, pourrait-on, au pis aller, neutraliser l'action du désinfectant à l'aide de substances chimiques appropriées ; mais cette opération introduit dans l'essai de nouveaux facteurs inconnus.

En conclusion, nous disposons de deux techniques de détermination des valeurs antibiotiques, qui nous ont donné, chacune, des résultats réguliers.

La première est facile à réaliser ; elle offre, cependant, l'inconvénient du transport d'antiseptique dans les subcultures. Mais il nous est possible de calculer cette erreur, et, par conséquent, de déceler les cas où elle est en cause.

La seconde, qui permet de supprimer cette cause d'erreur, est donc applicable à toutes les substances chimiques. Mais elle est beaucoup plus difficile à réaliser que la première, et, de plus, elle nous apporte un autre facteur d'incertitude qu'il est impossible d'évaluer.

Tenant compte de ces faits, nous croyons être en droit de conseiller d'utiliser la première technique dans tous les cas où elle sera valable, cas, répétons-le, qui englobent la majorité des substances antiseptiques, et de réserver la seconde technique aux seuls cas où la première ne sera pas applicable.

RESUMÉ

Nous avons, dans ce travail, cherché à mettre au point une méthode de mesure des valeurs antimicrobiennes des substances chimiques.

Pour ceci, nous avons étudié en détail, dans le *premier chapitre*, les méthodes jusqu'ici proposées pour cette mesure. Nous les avons discutées et nous avons montré que, si les méthodes de détermination des valeurs antigénétiques étaient, avec quelques améliorations, tout à fait valables, aucune des méthodes de mesure des valeurs antibiotiques ne nous semblait satisfaisante, même parmi celles qui sont officielles dans les pays étrangers.

Afin de pouvoir, à notre tour, mettre au point une méthode moins sujette à critique, nous avons dû, tout d'abord, étudier point par point les divers facteurs susceptibles de modifier l'activité germicide. Nous avons donc, dans le *deuxième chapitre*, examiné successivement l'influence exercée, sur l'activité germicide, par les propriétés de la substance désinfectante, par la qualité, la quantité des germes en expérience, par le milieu de suspension des germes, par la nature du milieu intermédiaire de l'essai, par la température, le temps d'action du désinfectant, les conditions de la subculture, et par les propriétés antigénétiques de la substance étudiée. Nous avons, pour ces différents points, exposé les résultats trouvés par les autres auteurs, et ceux que nous ont donnés nos essais personnels.

Ayant ainsi défini des bases précises, nous avons pu faire un choix parmi les principes théoriques pouvant servir de base à l'élaboration d'une méthode. Nous avons alors cherché à mettre au point une méthode de détermination des pouvoirs antibiotiques basée sur l'utilisation de *suspensions microbiennes* et donnant des chiffres précis, pouvant être retrouvés régulièrement dans les conditions de l'essai, et ayant, par eux-mêmes, une *valeur absolue*.

Nous avons donc été amenée à décrire et à appliquer une *première technique* de mesure des valeurs antibiotiques, d'exécution facile et rapide qui, sans éliminer l'importante cause d'erreur due au transport dans les subcultures de faibles quantités du désinfectant étudié, permet de calculer l'importance de cette erreur et de voir ainsi les cas, peu nombreux, où la technique peut se trouver en défaut.

Utilisant cette technique, nous avons étudié l'activité germicide d'un

certain nombre de substances chimiques, et particulièrement des désinfectants types : bichlorure de mercure, phénol, iode. Nous avons, pour chacun de ces corps, effectué un grand nombre de déterminations et étudié l'action antibiotique dans différents milieux. Ceci nous a permis, d'une part, de constater la régularité de la technique et de démontrer son suffisant degré de précision, et, d'autre part, de tirer brièvement des résultats obtenus quelques constatations d'intérêt théorique ou pratique.

Devant la nécessité d'éviter, dans certains cas, tout transport de substance antiseptique dans le milieu de subculture, nous avons été amenée à utiliser, comme l'avaient fait déjà quelques auteurs, la centrifugation, pour réaliser le lavage des germes traités par la substance antiseptique, tout en conservant les données précises déjà utilisées dans notre première technique. Cette *seconde technique*, qui peut s'appliquer indifféremment à tous les groupes de substances chimiques, nous a donné des résultats suffisamment réguliers. Le degré de précision, bien qu'un peu plus faible, est du même ordre que celui qui caractérise la première technique. Cette seconde technique est, cependant, de réalisation plus longue et plus difficile que la première. Enfin, l'acte même du lavage apporte, dans la notion du temps de contact, un facteur d'incertitude qui n'existait pas dans la première technique. Il convient donc, à notre avis, de réserver cette seconde technique aux rares cas où la première se trouve en défaut.

BIBLIOGRAPHIE

A

1. — ALLEN (A. W.). A comparative study of the bactericidal values of twenty one commonly used antiseptics. *Arch. Surgery*, **19**, 1929, p. 512, in *Chem. Abstracts*, **24**, 1930, p. 138.
2. — ALLEN (A. W.) and WRIGHT (I. S.). Determination of value of antiseptics. *J. of Am. med. assoc.*, n° **12**, 1931, p. 920.
3. — ALMQUIST (E.) and TROILI PETERSON (G.). Quantitative Desinfektionsversuche *Cent. f. Bakt. u. s. w.*, I. or. **39**, 1905, s. 477.
4. — AMSTER. Sitzungsberichte der Berliner Gesellschaft für Mikrobiologie. 13 novembre 1922, in *Cent. f. Bakt. u. s. w.*, I. or. **74**, 1922, s. à la suite du rapport de SELIGMANN.
5. — ANDERSON (J. F.) and MC. CLINTIC (Th. B.). Method of standardising desinfectants with and without organic matter. *J. of. inf. dis.*, **8**, 1911, p. 1.

B

6. — BACHRACH (E.). Variations biologiques d'un organisme monocellulaire. Accoutumance et anaphylaxie chez le bacille lactique. *Thèse Sciences*, Paris, 1924.
7. — BALLANTYNE. On certain factors influencing the survival of bacteria in water and in saline solutions. *J. of Bacteriology*, **19**, 1930, p. 303.
8. — BALLNER (F.). Zur Methodik der Prüfung von Desinfektionsmitteln. *Cent. f. Bakt.*, I. ref. **35**, 1904, p. 665.
9. — BAXTER. *Rep. med. off. Local Govt. Board*, n° **6**, 1876, p. 216, d'après TANNER et WALLACE.
10. — BECHHOLD (H.). Zur innern Antisepsis. *Zeitschr. f. phys. Chem.*, **52**, 1907, p. 177.
11. — BECHHOLD (H.). Halbspezifische Desinfektionsmitteln. *Zschr. f. Hyg.*, **64**, 1909, s. 113.
12. — BECHHOLD (H.) und EHRLICH (P.). Beziehungen zwischen chemischer konstitution und Desinfektionswirkung. *Zschr. f. physiol. Chem.*, **47**, 1906, s. 173.
13. — BECHHOLD (H.) und REINER (R.). Adsorptiv Desinfektion in Gegenwart anderer Adsorbentien. *Zschr. f. Hyg.*, **96**, 1922, s. 17.
14. — BECKMANN. D'après LAUBENHEIMER, in KOLLE, KRAUS und UHLENHUTH.
15. — BEHRENS (M.). Ueber die Bedingungen der Widerstandfähigkeit von Bakterien gegen Erhitzung. *Zschr. f. Hyg.*, **100**, 1923, s. 388.

16. — BEHRING (E. A.). Ueber Desinfektion, Desinfektionsmitteln und Desinfektionsmethoden. *Zschr. f. Hyg.*, **9**, 1890, s. 395.
17. — BEHRING (E. A.). Ueber die Bestimmung des antiseptischen Wertes chemischer Präparate mit besonderer Berücksichtigung einiger Quecksilbersalze. *Deutsch. med. Woch.*, n^{os} 41-43, 1889, in *Cent. f. Bakt. u. s. w.*, **7**, 1890, s. 105.
18. — BELLEI (G.). Verbesserte Methode zur Bestimmung des Wertes von chemischen Desinfektionsmitteln. *Münch. med. Woch.*, n^o 7, 1904, s. 301, in *Cent. f. Bakt. u. s. w.*, I. ref. **35**, 1904, s. 666.
19. — BESSON (A.) et EHRINGER (G.). La pratique de la désinfection. Baillière, 1926.
20. — BEYER (A.). In welcher Konzentration tötet wässriger Alkohol allein, oder in Verbindung mit anderen desinfizierenden Mitteln Entzündungs und Eiterungserreger am schnellsten ab? *Zschr. f. Hyg.*, **70**, 1911, s. 225.
21. — BIAL (M.). Antiseptische Function des Hions verdünnter Säuren. *Zschr. f. phys. Chem.*, **40**, 1902, s. 513.
22. — BICKERT (F. W.). Zur differential färbung töter und lebender Bakterien. *Cent. f. Bakt.*, I. or. **117**, 1930, s. 548.
23. — BIERNACKI. Ueber die Eigenschaft der Antiseptika die Alkoholgärung zu beschleunigen und über gewisse Abhängigkeit ihrer Kraft von der chemischen Baustruktur, der Fermentmenge und der Vereinigung miteinander. *Pflüger's Arch.*, **49**, 1890, s. 112, in *Cent. f. Bakt. u. s. w.*, **10**, 1891, 2, s. 297.
24. — BIRKAUG. Métaphène : I. A comparative study of commonly used disinfectants and antiseptics. II. Histologic changes produced by the intraveinuous administration of metaphene in rabbits. *J. of. amer. med. ass.*, **95**, 1930, p. 917.
25. — BITTER (L.). Ueber die Prüfung der Begutachtung von Desinfektionsmitteln. *Zschr. f. Hyg.*, **95**, 1922, s. 119.
26. — BLEYER (L.). Abtötung nach Kultur und Tierversuch bei Hitze behandelten Bakterien. *Zschr. f. Hyg.*, **99**, 1923, s. 98.
27. — BLYTH (W.). The standardisation of disinfectants. *J. Soc. Chem. ind.*, **23**, 1906, p. 1183.
28. — BLYTH (W.). The examination of some commercial carbolic acids and disinfecting powders. *J. of. Hyg.*, **8**, 1908, p. 83.
29. — BOAS (Fr.). L'anion phénomène phylétique (ou la séparation chimique des bactéries et des mycoses), traduit par KÆNIG (C. J.). Vigot, 1931.
30. — BOER. Ueber die Leistungsfähigkeit mehrerer chemischer Desinfektionsmitteln bei einigen für den Menschen pathogener Bakterien. *Zschr. f. Hyg.*, **9**, 1890, H. 3, s. 479, in *Cent. f. Bakt. u. s. w.*, **9**, 1891, s. 552.
31. — BOKORNY (Th.). Zur Normalisierung der Desinfektionsmitteln. *Chem. Zeitg.*, **46**, 192, s. 764.
32. — BONACORSI (L.). Ueber den Einfluss der Reaktion des mediums auf die Desinfektionswirkung organischer Farbstoffe. *Zschr. f. Hyg.*, **99**, 1923, s. 284.
33. — BRANHAM (S. E.). An improved technique for the comparison of antiseptics by yeast fermentation. *J. of. inf. dis.*, **44**, 1929, p. 142.
34. — BRIDRÉ. Sur le pouvoir antigénétique de quelques couleurs d'aniline. *C. R. de la Soc. de biol.*, **85**, 1921, 2, p. 645.
35. — BROOKS (S. C.). A theory of the mechanism of disinfection, hemolysis, and similar processus. *J. of. gen. Physiol.*, **50**, 1918, p. 61.
36. — BUCHANAN and FULMER. Physiology and Biochemistry of bacteria, 1930, Baillière, vol. II, chap. X.
37. — BÜCHHOLTZ. Antiseptica und Bakterien. *Arch. f. exp. Path. u. Pharm.*, **11**, 1875, s. 1.
38. — BÜCHHLOTZ, KÜHN und HABERKORN. D'après LEGENDRE, BARETTE et LEPAGE.
39. — BUJWID. The viability of bacteria in antiseptic solutions. In *Cent. f. Bakt.*, I. or. **106**, 1928, s. 21.

40. — BÜRGI (E.) und LAUBENHEIMER (K.). *Desinfections und Sterilisationslehre Chemisch. Teil*, in KOLLE, KRAUSS und UHLENHUTH, 1931, chap. XV, s. 987.
41. — BUSCHBAUM, RALPH and BLOOM (W.). The relative toxicity of antiseptics on bacteria and tissues in cultures. *Proc. Soc. exp. biol. a. med.*, **28**, 1931, p. 1060.

C

42. — CARDOT (G. et H.). Analogie entre les ferments lactiques et les streptocoques au point de vue de l'action des antiseptiques. *C. R. de l'Acad. des sciences*, **165**, 1917, p. 272.
43. — CARNOT (P.). Rapport sur l'état actuel de la question des antiseptiques. *C. R. de la Soc. de biologie*, **81**, 1918, p. 1166.
44. — CARNOT (P.) et DUMONT (J.). Technique d'étude de la pénétration des antiseptiques en milieu solide. *C. R. de la Soc. de biologie*, **81**, 1918, p. 1199.
45. — CHASSEVANT (A.). Action des sels métalliques sur la fermentation lactique. *Thèse de la Fac. de méd. de Paris*, 1897, et *Trav. lab. Ch. Richet*, VI, 1898, p. 264.
46. — CHAUVÉAU et ARLOING. Étude expérimentale de la septicémie gangreneuse. *Bull. de l'Acad. de méd.*, 1884, p. 604 et 1129.
47. — CHICK (H.). The process of disinfection by chemical agencies and hot water. *J. of Hyg.*, **10**, 1910, p. 237.
48. — CHICK (H.). An investigation of the laws of disinfection. *J. of Hyg.*, **8**, 1908, p. 92.
49. — CHICK (H.). A comparison of the power of germicide emulsified or dissolved with an interpretation of the superiority of the emulsified form. *J. of Hyg.*, **8**, 1908, p. 698.
50. — CHICK (H.) and MARTIN (C. J.). The principles involved in the standardisation of disinfectants and the influence of organic matter upon germicidal value. *J. of Hyg.*, **8**, 1908, p. 654.
51. — CHRISTIANSEN (J.). Zur Theorie und Praxis der Alkoholdesinfektion. *Zschr. f. phys. Chem.*, **102**, 1918, p. 275.
52. — CHURCHMANN (J. W.). The selective bactericidal action of gentian violet. *J. amer. med. ass.*, **74**, 1920, 145.
53. — CLARCK (A. J.). *Applied Pharmacology*, 1927, 3^e édit., London, Churchill.
54. — COHEN. Pharmacology and Toxicology of some organo mercuric compounds. *J. of Pharm. a. exp. therap.*, **35**, 1929, p. 343.
55. — COOPER (C. A.) and MASON (J.). Studies on selective bactericidal action. *J. of Hyg.*, **26**, 1927, s. 118.
56. — COOPER (E. A.) and HAINES (R. B.). The influence of temperature on bactericidal action. *J. of Hyg.*, **28**, 1928, p. 163.
57. — COOPER (E. A.) and FORNSTER (G. E.). Studies on selective bactericidal action. *Biochem. J.*, **18**, 1924, p. 941.
58. — COOPER (E. A.), WOODHOUSE and TORNSTER (G. E.). Das bakterizide Vermögen beeinflussende Bedingungen. *J. Soc. Chem. ind.*, **44**, 1925, p. 135.
59. — COULTHARD (C. E.). A test for disinfectant efficiency. *Pharm. Journ.*, **23**, 1929, p. 509.
60. — CRONER (F.). Zur Normalisierung der Desinfektionsmitteln. *Chem. Ztg.*, **46**, 1922, p. 470.
61. — CRONER (F.). Beitrag zur Theorie der Desinfektion. *Cent. f. Bakt.*, I. or. **61**, 1911, s. 175.
62. — CRONER (F.) und BAUMANN (C.). *Dtsch. med. Woch.*, **39**, 1911, s. 1704, d'après B. LANGE.
63. — CRUESS (W. V.) and RICHERT (P. H.). Effect of hydrogen ion concentration on the toxicity of sodium benzoate to micro-organisms. *J. of Bacteriology*, **17**, 1929, p. 363.
64. — CZAPECK. *Ber. d. deutsch. botan. Gesselsch.*, **28**, 1910, p. 470, d'après CHRISTIANSEN.
65. — CZAPLEWSKI. Beiträge zur bakteriologischen Prüfung von Desinfektionsmitteln. *Cent. f. Bakt.*, ref. **53**, 1912, p. 195.

D

66. — DAKIN (H. D.) and DUNHAM (E. K.). *Manuel des Antiseptiques*, traduit par M. DAUFRESNES. Vigot, 1918.
67. — DANNAPEL, d'après REICHEL, in KOLLE, KRAUSS und UHLENHUTH.
68. — DANNENBERG (H.). Ueber Hefegärung zur Frage der Gültigkeit der Arndt-Schulz'schen Regel. *Arch. f. exp. Path. u. Pharm.*, **154**, 1930, p. 211.
69. — DARANY. D'après REICHEL, in KOLLE, KRAUSS und UHLENHUTH.
70. — DAVAINÉ. Action des substances antiseptiques sur les bactéries. *C. R. de l'Acad. des sciences*, septembre 1875.
71. — DEFRIES. *J. of Sanitary Inst. London*, **18**, 1898, p. 416, d'après TANNER and WALLACE.
72. — DELBET. Action des antiseptiques sur le pus. *C. R. de l'Acad. des sciences*, **162**, 1916, p. 36.
73. — DELBET et FIESSINGER. D'après DUJARRIC DE LA RIVIÈRE.
74. — DELCOURT-BERNARD (E.). L'expertise des substances antiseptiques. *Revue d'hygiène*, nos 6 et 7, juin 1926.
75. — DELÉPINE (Sh.). The Standardizing of desinfectants. *J. of Roy. Inst. of Publ. Health.*, **16**, 1908, p. 577.
76. — DELÉPINE (Sh.). Contribution to the study of chemical desinfectants. *J. of the Soc. of Chem. Ind.*, **29**, 1910, p. 1 344, and **31**, 1911, p. 344.
77. — DEMELS. *Deutsch. Zschr. f. Chir.*, **203**, 1927, s. 612, d'après REICHEL.
78. — DENGLE (A.). Die Desinfektionswirkung von Sagrotan bei Verwendung optimaler Nährboden zur Nachkultur. *Hyg. Rundsch.*, **28**, 1928, d'après B. LANGE.
79. — DITTHORN (F.) und BARTEL (M.). Versuche zur Ausarbeitung einer genaueren Methodik zur Werbestimmung von Desinficienten. *Desinfektion*, **8**, 1923, s. 62, in *Cent. f. Bakt.*, ref. **76**, 1924, s. 32.
80. — DRESER (H.). Zum Argentium colloïdale des Arsneibuchs. *Zschr. f. exp. path. u. therap.*, **19**, 1917, s. 285.
81. — DUCLAUX, *Traité de microbiologie*, **3**, 1900, Masson.
82. — DUJARRIC DE LA RIVIÈRE. *La désinfection*. Le mouvement sanitaire, 1925, p. 16.
83. — DURAND (R.). Bactéries et médicaments antiseptiques. *Thèse de pharmacie*, Nancy, 1919.
84. — DUTHOIT (A.). Action sur différents microbes du chlorure de sodium à divers taux de concentration. *C. R. de la Soc. de biologie*, **89**, 1923, p. 548-550 et 553.
85. — DUYSER (C. H.) and LEWIS (W. K.). Eine neue methode zur Wertbestimmung von Desinfektionsmitteln. *J. of ind. and. engin. Chem.*, 1914, p. 198, in *Chem. Cent.*, **1**, 1914, p. 1531.

E

86. — EEKELMANN (G.). Ueber die Bakterein die die fraktion. Steriliserung lebend überdauern. *Cent. f. Bakt u. s. w.*, I. or. **48**, 1918, s. 141.
87. — EFFRONT (J.). Sur le mécanisme de l'acclimation des micro-organismes aux substances toxiques. *Soc. de biologie*, **83**, 1920, p. 807.
88. — EIJKMANN (C.). Ueber die Ursache der Wachstumshemmung in Bakterienkulturen. *Deutsch. med. Woch.*, 1907, s. 265.
89. — EIJKMANN (C.). Die Überlebenskurve bei Abtötung der Bakterien durch Hitze. *Biochem. Zschr.* **11**, 1908, s. 12.
90. — EISENBERG (Ph.). Untersuchungen über halbspezifische Desinfektionsvorgänge. I. Ueber die Wirkung von Farbstoffen auf Bakterien-Vitalfärbung-Entwicklungshemmung. *Cent. f. Bakt. u. s. w.*, I. or. **71**, 1913, s. 420.

91. EISENBERG (Ph.) und OKOLSKA. Untersuchungen zur Theorie der Desinfektion. *Cent. f. Bakt. u. s. w.*, **69**, 1913, s. 312.
92. — EMERY, d'après LEGENDRE, BARRETTE, LEPAGE.
93. — ESMARCH (E. von). Die Milzbrandsporen als Testobjekt bei der Prüfung von Desinfizienten. *Zschr. f. Hyg.* **1**, 1888, s. 67, in *Cent. f. bakt.*, **5**, 1889, s. 140.
94. — ESMARCH (E. Von). Entwicklungshemmung und Vernichtung der Bakterien und Parasiten, Das Kreolin. *Cent. f. Bakt. u. s. w.*, **2**, 1885, s. 295 und 329.
95. — ESMARCH (E. Von) und FRAENKEL. *Zschr. f. Hyg.*, **6**, 1886, s. 521, d'après SCHNEIDER et SELIGMANN.
96. — EULER (G. Von) und SANDBERG (V.). Gärung mit Teilweise vergifteter Hefe. *Cent. f. Bakt.*, **75**, 1928, s. 280.

F

97. — FAUSTUS and FLORENCE RUMBY, d'après REICHEL, in KOLLE-KRAUSS und UHLENHUTH.
98. — FICKER (M.). Ueber Lebensdauer und Absterben pathogener Keime. *Zschr. f. Hyg.*, **29**, 1898, p. 1.
99. — FINDEL. D'après REICHEL, in KOLLE, KRAUSS und UHLENHUTH.
100. — FISCHER. Die Deutung der Ergebnisse von Desinfektionsversuchen. *Cent. f. Bakt. u. s. w.*, I. or. **108**, 1928, s. 327.
101. — FLEISCHER (L.) und AMSTER (S.). Ueber den Einfluss der Reaktion des Mediums auf der Desinfektionswirkung organischer Farbstoffe. *Zschr. f. Hyg.*, **99**, 1923, s. 209.
102. — FOCKE, in FUHNER: Nachweis u. Bestimmung der Gifte auf pharmakologischen Wege. *Handb. d. biol. Arbeitsmethoden*, ABDERHALDEN, abt **4**, 1922, s. 522.
103. — FOWLER (C.). Some desinfectants values. *J. of. Roy. am. corps*, **9**, 1907, p. 44, d'après CHICK.
104. — FRAENKEL. Desinfekt. Eigenschaften der Kresole. Ein Betrag zur Desinfektionsfrage. *Zschr. f. Hyg.*, **6**, 1889, s. 521.
105. — FRIEDLER. D'après REICHEL, in KOLLE, KRAUSS und UHLENHUTH.
106. — FRIES (K.-A.). Eine einfache Methode zur genauen Bestimmung der Bakterienmengen in Bakterien suspensionen. *Cent. f. Bakt. u. s. w.*, **86**, 1921, s. 90.

G

107. — GEGENBAUER (V.). Studien über die Desinfektionswirkung des Sublimates. *Arch. f. Hyg.*, **90**, 1922, s. 23.
108. — GEGENBAUER (V.). Studien über die Desinfektionswirkung wässeriger Formaldehydlösungen. *Arch. f. Hyg.*, **90**, 1922, s. 239.
109. — GEGENBAUER (V.). Studien über den Desinfektionswert der gebräuchtesten Desinfektions flüssigkeiten. II. *Tag. d. deutsch. Verein. f. Mikrobiol.*, 1925, in *Cent. f. Bakt.*, **97**, 1926, s. 188.
110. — GEGENBAUER (V.) und REICHEL. Die Desinfektion Milzbrandiger Häute und Felle in Hcl + Nacl. *Arch. f. Hyg.*, **78**, 1912, s. 1.
111. — GEPPERT (J.). Zur Lehre von der Antiseptik. *Berl. klin. Woch.*, **26**, 1889, s. 789 und 819.
112. — GEPPERT. Die Desinfektionsfrage. *Deutsch. med. Woch.*, **17**, 1891, s. 797, 829 und 855.
113. — GEPPERT. Ueber Desinfektionsmittel und Desinfektionsmethoden. *Berlin. klin. Woch.*, **27**, 1890, s. 246.
114. — GEWEHR (F.). Untersuchungen über den Resistenzhöher Einfluss von Bakterien-Schutzstoffen in Desinfektionsversuchen. *Arch. f. Mikrobiol.*, **1**, 1930, s. 599.

115. — GÖBEL (R.). Ueber die Beziehungen zwischen der Dichte einer Bakterienaufschwemmung und ihrer Widerstandsfähigkeit gegen Erhitzung. *Zschr. f. Hyg.*, **100**, 1923, s. 380.
116. — GOSSELIN et BERGERON, 1789-1881, d'après LEGENDRE, BARETTE et LEPAGE.
117. — GRÉGERSEN (J.-P.). Untersuchungen über die desinfizierende Kraft der desinfizierenden Stoffe in Verhältnis zu ihrer Konzentration. *Cent. f. Bakt.*, I. Abt. or. **77**, 1915, s. 168.
118. — GREMPE (P. M.). Normalisierung der Desinfektionsmittel. *Chem. Ztg.*, **46**, 1922, s. 353.
119. — GRÜBER (VON M.). Ueber Methoden der Prüfung von Desinfektionsmitteln. VII^e Congr. f. Hyg. u. Derm. London 1891, in *Cent. f. Bakt. u. s. w.*, I. Abt. **11**, 1892, s. 115.
120. — GUÉGEN (F.). Sur une méthode précise de détermination des pouvoirs antiseptiques. *C. R. de la Soc. de biologie*, **64**, 1908, p. 344.
121. — GUILLIERMOND (A.). Sur la toxicité des colorants vitaux. *C. R. de la Soc. de biologie*, **104**, 1930, p. 468.
122. — GUNDEL und HABS. Ueber die Resistenz von Milzbrandsporen gegen Hitze und Chemikalien. *Desinfektion*, **10**, 1925, s. 143.
123. — GUTFELD (F.) und PINCUSSEN (L.). Untersuchungen über die Wirkung des Lichtes auf Bakterien. *Cent. f. Bakt.*, I. or. **118**, 1930.
124. — GUTSTEIN. Zur Theorie der Desinfektion. *Cent. f. Bakt.*, I. or. **104**, 1927, s. 410.

H

125. — HAHN (M.). Zur Theorie und Praxis der chemischen Desinfektion. *Zschr. f. Hyg.*, **98**, 1922, s. 569.
126. — HAILER. Die chemischen Grundlagen der Desinfektionswirkung (Bericht über die q. Tag. d. Deutsch. Verein. f. Mikrobiol., 1922, in Würzburg), in *Cent. f. Bakt.*, **89**, 1922, s. 2.
127. — HAILER. Zur vergleichenden Prüfungs- und Wertbestimmungsmethode für Desinfektionsmittel. *Deutsch. med. Woch.*, 1921, s. 1384, in *Cent. f. Bakt.*, ref. **73**, 1922, s. 188.
128. — HAMILTON (H. C.). Facts and fallacies in disinfection. *Read before the Lab. sect. amer. Publ. Health ass.*, 26 october 1916.
129. — HAMILTON (H. C.) and TATSUZO OHNO. The bacteriological standardisation of disinfectants, some further suggestions. *Coll. paper from the Res. Lab. Parke, Davis and Co.*, Detroit Mich., **3**, 1915, p. 163, in *Cent. f. Bakt.*, ref. **66**, 1917, 436.
130. — HAMMER. Ueber die desinfizierende Wirkung der Kresole und die Herstellung neutraler wässriger Kresollösungen. *Arch. f. Hyg.*, **12**, 1891, s. 359.
131. — HAYAISHI. Zur Absterbeordnung der Bakterien. *Zschr. f. Hyg.*, **102**, 1924, s. 87.
132. — HEIDER. Ueber die Wirksamkeit der Desinfektionsmitteln bei erhöhter Temperatur. *Arch. f. Hyg.*, **15**, 1892, s. 341.
133. — HEIM (L.). *Lehrbuch der Bakteriologie*. 3^e Aufl. 1906, chap. *Desinfektion*.
134. — HÉRELLE (D'). *Le Bactériophage*. Paris, Masson, 1921, p. 121.
135. — HERZOG (R. O.) und BETZEL (R.). Theory of Disinfection. *Zschr. f. phys. Chem.*, **67**, 1910, p. 309, a. **74**, 1911, p. 221.
136. — HEULE. Ueber Creolin und seine wirksamen Bestandteile. *Arch. f. Hyg.*, **9**, 1889, s. 180.
137. — HEWLETT and TANNER. Disinfection and Disinfectants. *The Lancet*, Marsh 13, 1909, p. 741, et *Pharm. J.*, **31**, 1910, p. 159.
138. — HEWLETT and HALL. *Journ. of Hyg.*, **2**, 1910, s. 473.
139. — HEWLETT and KENWOOD. Some observations upon the practical standardisation of disinfectants. *J. of Roy. San. Inst.*, **27**, 1906, p. 1.

140. — HILAIRE (SAINT-). Influence de la température sur l'action de quelques substances toxiques. *Thèse Pharmacie*, Paris, 1888.
141. — HIMEBAUGH. Travail non publié, d'après WRIGHT.
142. — HIRSCHFELDER (A. D.) and DECHARD (G. M.). Inhibiting effect of lipoids upon actions of antiseptics. *Proc. soc. exp. biol. a. med.*, **25**, 1928, p. 834.
143. — HIRSCHFELDER (A. D.) and WRIGHT (H. N.). Studies on the colloid chemistry of anti-sepsis and chemotherapy. *J. of. Pharmacol.*, **38**, 1930, p. 411-413, and **39**.
144. — HÖBER. *Physikalische Chemie der zelle und der Gewebe*, Leipzig, 1922.
145. — HÜCKEL (R.). Ueber die Abhängigkeit der Hitzeresistenz verschiedenen Bakterien-suspensionen von ihrer Dichte. *Zschr. f. Hyg.*, **108**, 1926, s. 730.
146. — HUEPPE. *Berlin Klin. Woch.*, **13**, 1886, p. 609, d'après ULLMANN.
147. — *Hygienic Laboratory method. Hyg. Labo. Bull.*, **82**, 1912, and Revision, in *Publ. Health. Report*, **36**, 1921, p. 1 559.

I

148. — IKEDA (K.). Die chemischen Grundlagen der Lehre von den Giftwirkung und Desinfektion. *Zschr. f. Hyg.*, **25**, 1897, s. 95.
149. — ISAACS (M. L.). Factors wich influence tests of bacterial survival. I. The effect of varying periods of incubation of their survival test culture. *J. of Bact.*, **20**, 1930, p. 161.
150. — ISAACS (M. L.). II. The effect of the pH of the survival test culture on results obtained wich a saprophytic tubercle bacillus. *J. of. Bact.*, **20**, 1930, p. 175.

J

151. — JADIN. L'influence de l'iode sur les microbes. *C. R. de la Soc. de biologie*, **105**, 1930, p. 461.
152. — JALAN DE LA CROIX. Das Verhalten der Bakterien des Fleischwassers gegen einige Antiseptica. *Arch. f. exp. Path. u. Pharm.*, **13**, 1881, p. 175.
153. — JOACHIMOGLU (G.). Ueber den Einfluss des Wasserstoffionenkonzentration auf die antiseptische Wirkung des Sublimats. *Biochem. Zschr.*, **134**, 1923, s. 489.
154. — JENSEN (H.). An experimental study of certain benzyl compounds. *J. of. Pharmacol.*, **26**, 1926, p. 213.

K

155. — KENDALL und EDWARDS (M. R.). A method for determining the germicidal value and penetrating power of liquid disinfectant. *J. of. inf. dis.*, **8**, 1911, p. 250.
156. — KESCHICHIAN (K. M.) et LANGE (B.). Die Schädigung pathogener Keime durch Erhitzung gemessen an ihrer Fortpflanzungsenergie in künstlichen Kultur und ihrer Virulenz. *Zschr. f. Hyg.*, **101**, 1924, p. 88.
157. — KLARMANN (E.), SHERWOOD (V. A.) and Von WOWERN (J.). The germicidal action of halogen derivates of phenol and resorcinol and its impairment by organic matter. *J. of. Bact.*, **17**, 1929, p. 423.
158. — KLEIN. Lettre à Ainstie Walker, à la suite de l'article de RIDEAL et WALKER.
159. — KLIMMER. Prüfung der Wirksamkeit chemischer Desinfektions mitteln. *Die tierärztl. Wschr.*, 1921, s. 309, in *Cent. f. Bakt.*, ref. **73**, 1922, s. 37.
160. — KOCH (R.). Ueber Desinfektionsmitteln. *Mitt. a. d. Kaiserl. Gesund. heitsamte.*, **I**, 1881, s. 1 und 243.

161. — KOKUHO (K.). Ueber die Anfertigung und Aufbewahrung von Sporensidenfäden für Desinfektionszwecke. *Cent. f. Bakt.*, I. or. **34**, 1903, s. 725.
162. — KOLLE (W.), KRAUSS (R.) und UHLENHUTH (P.). *Handbuch der pathogenen mikro-organismen*, Dritte Auflage, **3**, 1931, s. 385-1 826.
163. — KRAHÉ. Zur Theorie der Desinfektionswirkung des Sublimats. *Klin. Woch.*, **2**, 1924, s. 70.
164. — KRÖNIG (B.) und PAUL (T.). Die Chemischen Grundlagen der Lehre von der Giftwirkung und Desinfektion. *Zschr. f. Hyg.*, **25**, 1897, s. 1.
165. — KRUMIEDT, d'après REICHEL, in KOLLE, KRAUSS und UHLENHUTH.
166. — KÜHL (H.). Eine methode zur Bestimmung der Desinfektionskraft. *Cent. f. Bakt.*, I. or. **71**, 1918, s. 331.
167. — KURODA (T.). Einfluss der Wasserstoffionenkonz. auf die antisept. Wirkung einiger Phenole und aromatisch. Säuren. *Biochem. Zschr.*, **169**, 1926, s. 281.

L

168. — LAMBERT (R.). The comparative resistance of bacteria and human tissue cells to certain common antiseptics. *J. of. exp. med.*, **24**, 1916, p. 683.
169. — LANGE (B.). Keimmenge und Desinfektionserfolg. Ein Betrag zur Methodik von Desinfektionsversuchen. *Zschr. f. Hyg.*, **96**, 1922, s. 92.
170. — LANGE (B.). Beiträge zur methodik der Desinfektionsmittelprüfung. *Zschr. f. Hyg.*, **100**, 1925, s. 249.
171. — LANGE (B.). Die Prüfung des Desinfektionserfolg durch Kultur und Tierversuche *Zschr. f. Hyg.*, 1926, **105**, s. 215.
172. — « THE LANCET. » The standardisation of desinfectants. *The Lancet*, **177**, 1909, p. p. 1 454, 1516 and 1612, et Critisme of our Commissioners Report. *The Lancet*, 1909, n° 4 503, p. 1 841.
173. — LAUBENHEIMER (K.). Phenol und seine Derivate als Desinfektionsmitteln. Wien und Berlin, 1909. — Chlorothymol als desinfectant. *Deutsch. med. Woch.*, **54**, 1928, s. 481.
174. — LEGENDRE, BARETTE et LEPAGE. Traité pratique d'antisepsie appliquée à la thérapeutique et à l'hygiène, I, 1888, chap. II, p. 33.
175. — LEGROUX et ELIAVA. Sur un liquide où se maintient invariable le nombre de bactéries des cultures. *Ann. I. P.*, 1921, p. 713.
176. — LEMON (J. S.). In KOLLE, KRAUSS und UHLENHUTH.
177. — LEONARD (G.). Limitations of phenol coefficients tests in determining germicidal activities. *J. of. inf. dis.*, **48**, 1931, p. 358.
178. — LEONARD (G.) and HEACOK (E.). Comparative results from the testing of various germicidal agents. *Amer. J. of Pharm.*, **100**, 1928, p. 103.
179. — LIESE (W.) und MENDEL (B.). Die Bedeutung der Bakterienoberfläche in chemischen Desinfektionsversuchen., zugleich ein Vorschlag zur Prüfung chemischer Desinfektionsmittel. *Zschr. f. Hyg.*, **100**, 1923, s. 454.
180. — LINGELSHEIM (Von). Über die Bedeutung der Salze für die bakt. Wirkung des Serums. *Zschr. f. Hyg.*, **37**, 1901, p. 131.
181. — LIPSCHITZ (W.). Untersuchungen über die therap. Wertbestimmung von Desinfektionsmitteln durch Messung der Zellatmung. *Klin. Woch.*, **2**, 1923, s. 1 689, in *Cent. f. Bakt.*, I. or. **90**, 1923, s. 569.
182. — LOCKEMANN (G.). *Desinfektion*, **10**, 1925, s. 48, d'après WEYRAUCH.
183. — LOCKEMANN (G.) und ULRICH (W.). Wertbestimmung von Phenolderivaten nach verschiedenen Verfahren. *Zschr. f. Hyg.*, **113**, 1932, s. 475.

184. — LOCKEMANN (G.) und PILCHER (H.). Adsorption und Desinfektion. *Zschr. f. Hyg.*, **108**, 1927, s. 125 und 746.
185. — LOEB (J.) and NORTHROP (J. H.). On the influence of food and temperature upon the duration of life. *Journ. of biol. Chem.*, **32**, 1917, 103.
186. — LUBENEAU. Nochmals die Hornstäbchen Methode zur Prüfung von Desinfektionsmitteln. *Cent. f. Bakt.*, I. or. **113**, 1929, s. 537.
187. — LUMIÈRE (A.). Action comparée des antiseptiques sur le pus et sur les cultures pures. *C. R. de l'Acad. des sciences* **163**, 1916, p. 309.

M

188. — MADSEN (Th.) and NYMANN (M.). Zur Theorie der Desinfektion. *Zschr. f. Hyg.*, **57**, 1907, p. 388.
189. — MAGOON. Studies on bact. spores. I. Therm. resist. asc. *J. of Bact.*, **11**, 1926, p. 253.
190. — MARCHOUX (M.). *Revue d'hygiène*, 1923, p. 261, d'après DUJARRIC DE LA RIVIÈRE.
191. — MARCUS et PINET. 1882, d'après LEGENDRE, BARETTE et LEPAGE.
192. — MARTENS. Beiträge zur Kenntnis der Antiseptika. *Virchow's Arch.*, **112**, 1888, H. 2.
193. — MASSON (L.). Essai sur l'adaptation des bactéries aux antiseptiques. *Thèse Pharmacie*, 1910.
194. — MILLER (W. D.), d'après LAUBENHEIMER, in KOLLE, KRAUSS und UHLENHUTH.
195. — MIQUEL (P.). Annales de l'observatoire de Montsouris, Paris, 1883 et 1884, et *Manuel pratique d'analyse bactériologique des eaux*, Paris, 1891.
196. — MIQUEL (P.) et CAMBIER (R.). *Traité de bactériologie*, Masson, Paris, 1902, p. 77.
197. — MOORE (Q.). Ueber die Wertbestimmung von Desinfektionsmitteln nach Rideal und Walker. *J. Soc. Chem. ind.*, **45**, 1926, p. 472.
198. — MOREL (A.) et ROCHAIX (A.). Recherches comparatives sur l'action microbicide, vapeurs de quelques essences végétales. *C. R. Soc. de biologie*, **85**, 1921, p. 861.
199. — MOREL (A.) et ROCHAIX (A.). Recherches sur le pouvoir infertilisant de quelques essences végétales. *Bull. des sciences pharmacol.*, 1928, p. 631.
200. — MORGENROTH. Zur Kenntnis der Beziehungen zwischen chemischer Konstitution und chemotherapeutischer Wirkung. *Berlin. Klin. Woch.*, **3**, 1917, s. 55.
201. — MÜLLER (A.). Ueber die Prüfung von Desinfektionsmitteln. *Zschr. f. Hyg.*, **99**, 1923, s. 94.

N

202. — NEUFELD. Desinfektionspraxis. (Bericht über die 9. Tagung der Deutsch. Verein. f. Mikrobiol., **2**, 1922, Würzburg.), in *Cent. f. Bakt. u. s. w.*, I. or., **89**, 1922, s. 28.
203. — NIAL (O'). 1872, *Army medical Report for 1871*, Londres 1872.
204. — NICOLLE et JOUAN. Essai de la valeur antiseptique d'un corps. *Cours Inst. Past.*, Legroux, 1923.
205. — NIETHAMMER (A.). Die Stimulationswirkung von Giften auf Pilze und das Arndt-Schulz'sche Gesetz. *Biochem. Zschr.*, **184**, 1927, s. 370.
206. — NORTH and PARK. Standard. of milck past. *Amer. J. of Hyg.*, **7**, 1927, p. 147.
207. — NOVY, d'après BRAUN (H.). Zur Assimilation und Dissimilation bei Bakterien. *Cent. f. Bakt.*, I. or. **122**, 1931, p. 5.
208. — NYIRI. Studies on the standardization of germicides. *J. amer. pharm. ass.*, **17**, 1928, p. 449.

O

209. — OBERSTADT, d'après BRAUN. Zur Assimilation und Dissimilation bei Bakterien. *Cent. f. Bakt.*, or. **122**, 1931, p. 5.
210. — OERSKOW (J. L.). Sur la thermo-résistance des bact. tuberculeuses. *C. R. de la Soc de biologie*, **92**, 1925, p. 400.
211. — ORNSTEIN (O.). Über Desinfektionsmitteln und die Abhängigkeit ihrer Wirkung von den Lösungsmitteln. *Zschr. f. Hyg.*, **106**, 1926, s. 327.
212. — OTSUKI (U.). Untersuchungen über die Wirkung des Desinfektionsmittels auf die an verschiedenen Stoffen haftenden Milzbrandsporen. *Cent. f. Bakt.*, **27**, 1900, s. 291.
213. — OTTOLENGHI (D.). Ueber das Desinfektionsvermögen des $HgCl_2$. *Desinfektion*, **I**, 1908, s. 291 ; **2**, 1909, s. 105 ; **3**, 1910, s. 73 ; **4**, 1911, s. 65 und 113, d'après B. LANGE.

P

214. — PANETH (L.). Ueber experimentelle Veränderungen der chemischen Resistenz von Bakterien. *Klin. Woch.*, **2**, 1906, s. 1603.
215. — PANNISSET (L.), VERGE (J.) et CARNEIRO (V.). Action comparée de l'eau distillée et du sérum physiologique sur la vitalité de quelques microbes. *Annales I. P.*, **39**, 1925, p. 81.
216. — PAUL (Th.). Der chemische Reaktionsverlauf beim Absterben trockener Bakterien bei niederen Temperaturen. *Biochem. Zschr.*, **18**, 1909, s. 1.
217. — PAUL (Th.). *Entwurf zur einheitlichen Werbestimmung chemischer Desinfektionsmittel*. Berlin, 1901.
218. — PAUL (Th.), BIRSTEIN (G.) und REUSS (A.). Beiträge zur Kinetik der Giftwirkung von gelösten Stoffen. *Biochem. Zschr.*, **29**, 1910, s. 202 und 239.
219. — PAUL (Th.) und KRÖNIG (B.). Die gesetzmäßigen Beziehungen zwischen Lösungszustand und Wirkungswert der Desinfektionsmitteln. *Cent. f. Bakt.*, **21**, 1897, s. 710.
220. — PAUL (Th.) und PRALL. Die Wertbestimmung von Desinfektionsmitteln mit staphylococcus die bei der Temperatur flüssigen Luft aufbewahrt wurden. *Arb. d. Kaiserl. ges. amt.*, **26**, 1907, s. 73 und 424.
221. — PERRY MORGAN. D'après DAKIN, *Brit. med. Journ.*, 13 may 1916.
222. — PETERSON. *J. Lab. a Clin. méd.*, 1922, p. 223, d'après BRANHAM.
223. — PETIT (A.) (1872). *C. R. de l'Acad. des sciences*, 1872, d'après MIQUEL.
224. — PHELPS (E. B.). The application of certain laws of physical chemistry in the standardization of desinfectants. *J. inf. dis.*, **8**, 1911, p. 27.
225. — PILCHER (Y. D.) and SÖLLMANN (T.). Organic protein and colloidal silver compounds : their antiseptic efficiency and silver ion content as a basis for their classification. *J. Lab. a. clin. med.*, **23**, 1922, p. 301, in *Cent. f. Bakt.*, **83**, 1926, s. 84.
226. — PLASTRIDGE and WALLEY (G.). Studies on the desinfectant properties of certain alkyl phenols. *Cent. f. Bakt.*, **I** or. **110**, 1929 ; **111**, 1929.
227. — POETSCHKE (P.). Keimtötende Wirkung von Zahnzement. *J. ind. eng. chem.*, **7**, 1915, p. 195.
228. — POPOFF, d'après DUCLAUX, chap. XXVI : *Variations de l'action antiseptique*.
229. — PORTIER (P.). Résistance aux agents chimiques de certaines races de *Bacillus subtilis*, provenant des insectes. *C. R. de l'Acad. des sciences*, **161**, 1915, p. 397.
230. — PORTIER (P.) et KLING (A.). Valeur antiseptique des peintures aux dérivés phénoliques chlorés ou non chlorés. Séance de l'Acad. de médecine, 10 novembre 1931, in *Union pharm.*, **73**, 1932, p. 108.

231. — POTTHOF. Ueber Einwirkung ultravioletter Strahlen auf Bakterien u. bakt. Sporen. *Desinfektion*, **6**, 1921, p. 10, d'après B. LANGE.
232. — PRINGLE (J.). Some experiments on substances resisting putrefaction. *Observ. on the dis. of the Army*, 7^e édit., London, 1775, d'après LEGENDRE, BARETTE et LEPAGE.
233. — PROSKAUER. Einheitliche Regelung der Prüfungsmethoden für Desinfektionsapparate und Desinfektionsmitteln. *Kong. f. Hyg., u. Desf.*, Berlin, **2**, 1907, s. 972.
234. — PÜLKE (K.). Zur Normalisierung der Desinfektionsmitteln. *Chem. Ztg.*, **46**, 1922, s. 897.

R

235. — RAHN (O.). Ueber den Einfluss der Stoffwechselprodukte auf das Wachstum der Bakterien. *Cent. f. Bakt.*, ref. **15**, 1906, s. 417.
236. — RAPP (R.). Ein Betrag zur Wertbestimmung chemischer Desinfektionsmitteln. *Cent. f. Bakt.* **44**, 1906, s. 126.
237. — REDDISH (G. F.). Examination of disinfectants. *Amer. J. Pub. Health*, **15**, 1925, p. 534; **16**, 1926, p. 283; **17**, 1927, p. 320.
238. — RÉGNIER (J.). Méthodes de mesure de l'activité des anesthésiques locaux. *Thèse Sciences*, Paris, 1929.
239. — RÉGNIER (J.) et DAVID (R.). Contribution à l'étude de la multiplication microbienne. *C. R. de l'Acad. des sciences*, **193**, 1931, p. 1119 et 1487. — Thèse David: Contribution à l'étude numérique de la multiplication du bacille pyocyanique dans différents milieux de culture liquides. *Thèse Sciences*, Paris, 1931.
240. — RÉGNIER (J.) et KAPLAN (A.). Contribution à l'étude numérique de la multiplication microbienne. Influence du nombre des microbes ensemencés sur la vitesse de leur multiplication. *C. R. de l'Acad. des sciences*, **194**, 1932, p. 323. — Thèse Kaplan (A.): Influence du nombre des microbes ensemencés sur la multiplication du bacille pyocyanique dans un milieu de culture liquide. *Thèse Pharmacie*, Paris, 1931.
241. — RÉGNIER (J.) et LAMBIN (S.). Contribution à l'étude de la mesure des valeurs antimicrobiennes des substances chimiques. *Bull. de l'Acad. de méd.*, **105**, 1931, n° 11.
242. — REICHEL (H.). Desinfektions- und Sterilisationslehre. I. *Allgemeiner und physikalischer Teil*, in KOLLE, KRAUSS und UHLENHUTH, 1931, Bd. III, chap. XIV, p. 385.
243. — REICHEL (H.). Zur Theorie der Desinfektion. *Biochem. Zschr.*, **22**, 1909, s. 149, 177, und 201.
244. — REICHEL (H.) und RIEGER (H.). Die Ausgleich u. Fehlerrechnung bei Desinfektionsversuchen. *Arch. f. Hyg.*, **98**, 1927, s. 23.
245. — REICHENBACH (H.). Die Absterbeordnung der Bakterien und ihre Bedeutung für Theorie u. Praxis der Desinfektion. *Zschr. f. Hyg.*, **69**, 1911, s. 171.
246. — REICHENBACH (H.). Die theoretischen Grundlagen der Desinfektion. *Bericht, über die 9. Tagung der Deutsch. Verein. f. mikrobiol.*, 1922, in WÜRZBURG, in *Cent. f. Bakt.*, I. or., **89**, 1922, s. 15.
247. — REICHENBACH (H.). Die theoretischen Grundlagen der Normalisierung der Desinfektionsmitteln. *Desinfektion*, 1921, s. 241. in *Cent. f. Bakt.*, ref. **73**, 1922, s. 37.
248. — REITER (H.) und ARDNT (W.). Zur Wertbestimmung der Desinfektionsmitteln. *Deutsch. med. Wschr.*, **46**, 568, 1920.
249. — RICHET (C.) et CARDOT (H.). Des antiseptiques réguliers et irréguliers. *C. R. de l'Acad. des sciences*, **165**, 1917, p. 491.
250. — RICHET (L.). De l'action toxique suivant la température. *C. R. de la Soc. de biologie*, 1805, p. 239.
251. — RIDEAL (S.). Lettre à l'éditeur du journal *The Lancet*. *The Lancet*, 1909, n° 4 503, p. 1 849.

252. — RIDEAL (S.) and RIDEAL (E. K.). Some remarks on the Rideal Walkertest and on the Rideal Walker test method. *J. inf. dis.*, **10**, 1912, p. 248.
253. — RIDEAL (S.) and WALKER (J. T. A.). The standardisation of desinfectants. *J. of the Sanitary inst.*, **24**, 1903, p. 424.
254. — RIDEAL (S.) and WALKER (J. T. A.). *Approved technique of the Rideal Walker test*, London, 1921, Lewis and Co, d'après BIRKANG.
255. — RIEGER und TRAUNER. Ueber die Wirksamkeit chemischer Desinfektionsmittel auf Anaerobier. *Arch. Klin. Chir.*, **40**, 1930, 160.
256. — REYMAN (G. C.) and NYMAN. Studien über Desinfektion, mit besonderer Hinblick auf die Methode von Krönig u. Paul. *Cent. f. Bakt.*, **58**, 1911, s. 339.
257. — ROCHAIX. Sur la théorie de la désinfection par les agents chimiques. *C. R. de la Soc. de biologie*, **72**, 1912, p. 322.
258. — ROCHAIX. Lois et théorie de l'action germicide des substances chimiques. *Revue d'hygiène et de police sanitaire*, **34**, 1912, p. 266.
259. — RODET (M. A.). Expériences sur la valeur antiseptique du savon commun. Remarques sur l'action des antiseptiques en général et sur la biologie du staphylocoque pyogène. *C. R. de la Soc. de biologie*, **58**, 1905, p. 264.
260. — ROSE (E. S.). Testing of common antiseptics. *Amer. J. of Pharm.*, **101**, 1928, p. 52.

S

261. — SCHAEFFER (H.). Die Desinfektionswirkung der Chininderivate gegenüber Diphtheriebazillen. *Biochem. Zschr.*, **83**, 1917, p. 269.
262. — SCHAEFFER (J. H.) and TILLEY. Further investigations of the relation between the chemical constitution and the germicidal activity of alcohols and phenols. *J. of Bact.*, **14**, 1927, p. 259.
263. — SCHEURLIN und SPIRO. Die gesetzmässigen Beziehungen zwischen Lösungsstand und Wirkungswert der Desinfektionsmittel. *Münch. med. Wschr.*, **44**, 1897, s. 81.
264. — SCHIEMANN und ISHIWARA. Vergleichende Untersuchungen über die Wirkung von chemotherap. Präparaten und anderer Antiseptika auf Bakterien. *Zschr. f. Hyg.*, **77**, 1914, s. 49.
265. — SCHMIDT (H.). Zur Frage der Einwirkung von Kochsalzlösung auf Bakterien. *Cent. f. Bakt.*, I. or. **91**, 1924, s. 510.
266. — SCHMIDT-WEYLAND und KOLTZSCH. Untersuchungen über ein neuer Desinfektionsmittel « Ufinol ». *Zschr. f. Hyg.*, **106**, 1926, s. 754.
267. — SCHNEIDER (H.). Desinfektion und Desinfektionsmitteln. *Ullmann, Enzyklopedie der technischen Chemie*, **3**, 1916, s. 683. — *Deutsch. med. Woch.*, **44**, 1909, s. 150.
268. — SCHNEIDER (H.) und SELIGMANN (E.). Studien zur Wertbestimmung chemischer Desinfektionsmitteln. *Zschr. f. Hyg.*, **58**, 1908, s. 413.
269. — SCHOLLER (W.) und SCHRAUTH (W.). Über die Desinfektionskraft komplexer organischer Quecksilberverbindungen. *Zschr. f. Hyg.*, **70**, 1911, 24.
270. — SCHÖLLER (W.) und HECKE (A.). Zur Theorie der Desinfektion. *Biochem. Zschr.*, **140**, 1923, s. 28.
271. — SCHUMACHER (J.). Zur chemie der Desinfektion und über Beziehungen zwischen chemischen Konstitution und pharmacol. Wirkung, zugleich ein Betrag zur Vitalfärbung. *Cent. f. Bakt.*, I. or. **98**, 1926, s. 67 und **107**, 1928, s. 175.
272. — SCHULTZ (H.). Ein Apparat zur graphischen Darstellung von Gärungsvorgängen. *Pflügers Archiv. f. d. ges. Physiol.*, **120**, 1907, p. 51.
273. — SCHULTZ und ARDNT. *Pflüg. Arch. f. d. ges. Physiol.*, **42**, 1888, s. 517, in NIETHAMMER.
274. — SCOTT and HILL. Action of mercurochrome and tincture of iodine in skin desinfection. *Journ. Urol.*, **14**, 135, 1925, d'après BIRKANG.

275. — SEIFFERT. Die Abtötung pathogener Keime unter Glyzerineinwirkung. *Cent. f. Bakt.*, I. or. **74**, 1914, s. 644.
276. — SELIGMANN. Die Bedeutung der Wassertoffionenkonzentration für die Prüfung von Desinfektionsmitteln. *Cent. f. Bakt.*, I. or. **74**, 1922, p. 481.
277. — SETTLER (H.). D'après LEGENDRE, BARETTE et LEPAGE.
278. — SHIPPEN (L. P.). A Fallacy in the standard methods of examining desinfectants. *Am. J. Publ. Health.*, **18**, 1928, p. 1231.
279. — SMITH (A.). *Desinfectants and Desinfection*. Edimbourg, 1869, d'après MIQUEL.
280. — SOMERVILLE and WALKER. The standardisation of desinfectants in the presence of organic matter. *Sanitary records*, **38**, 1907, p. 485.
281. — SPIRO and BURNS. Zur Theorie der Desinfektion. *Arch. f. exp. Path. u. Pharm.*, **44**, 1898, p. 355, d'après MISS CHICK.
282. — STEIGER (M.) und DÖLL (A.). Untersuchungen über die Desinfektionskraft des Sublimates. *Zschr. f. Hyg.*, **73**, 1913, s. 324.
283. — STERNBERG. *A manual of Bacteriology*, New-York, 1893, p. 156, d'après WOODHEAD et PONDER.
284. — STOCKMAYER (W.). Vergleichende Untersuchungen über die Vermehrungsfähigkeit geschwächter Keime in künstlichen Nährboden und in Tierkörper. *Archiv. f. Hyg.*, **95**, 1925, s. 79.
285. — STORM VON LEUWEN und LEHEUX (J. H.). Ueber den Zusammenhang zwischen Konzentration und Wirkung von verschiedenen Arzneimitteln. *Pföger's Arch. f. d. ges. Physiol.*, **177**, 1919, s. 250.
286. — SUIFFET (P.). Action antiseptique de l'iode sous diverses formes galéniques. *J. Pharm. et Chim.*, **8**, 1928, p. 398. *Thèse Pharmacie*, 1928.
287. — SÜPPFLE (K.). Weitere Untersuchungen über optimale Nährboden zur Nachkultur bei der Prüfung von Desinfektionsverfahren. *Arch. f. Hyg.*, **87**, 1918, s. 232.
288. — SÜPPFLE (K.) und DENGLE (A.). Die Bedeutung optimaler Nährboden zur Nachkultur bei der Prüfung von Desinfektionsverfahren. *Arch. f. Hyg.*, **85**, 1916, s. 189.
289. — SÜPPFLE (K.) und HOFFMANN. Experimentelle Untersuchungen über die bakterizide Wirkung von Silargel und Adsorgan. *Arch. f. Hyg. u. Bakt.*, **103**, 1930, s. 365.

T

290. — TANNER (F. W.) und WALLACE (G. I.). The standardisation of desinfectants. *Cent. f. Bakt.*, I. or. **114**, 1929, s. 161.
291. — TÉTROP, d'après DELCOURT-BERNARD.
292. — TIFFENEAU (M.). *Désinfectants*, extrait du *Cours d'hygiène de la Faculté de médecine*, Masson, 1927.
293. — TIFFENEAU (M.). La Pharmacologie en 1930. *Paris Médical*, 1930, p. 555.
294. — TILLEY (T. W.). Investigations of the germicidal value of some of the chlorine desinfectants. *J. agr. Res.*, **20**, 1920, p. 85, in *B. I. P.*, 1921, p. 424.
295. — TINKER and SUTTON. Ineff. of common used skin antiseptics. *J. amer. med. ass.*, **27**, 1928, p. 1347.
296. — TRAUBE (J.) und SOMOGYI (R.). Zur Theorie der Desinfektion. *Biochem. Zschr.*, **120**, 1921, s. 90.

U V

297. — ULLMANN. *Enzyklopedie der Technischen Chemie*, 1914.
298. — VIGNATI (J.) und SCHNABEL (P.). Beitrag zur Kenntnis der Desinfektionswirkung der Metallsalze. *Cent. f. Bakt.*, I. or. **109**, 1928, s. 464 und 475.

299. — VINCENT (H.). Sur la prophylaxie de l'infection des plaies de guerre. Étude comparée des divers agents antiseptiques. *C. R. de l'Acad. des sciences*, 1917, p. 153.

W

300. — WALDO (Y. H.), SHOOW (H. A.) and POWELL (H. M.). The bacteriological evaluation of some new water soluble organo mercury compounds. *J. of. Bact.*, **21**, 1931, p. 323.
301. — WALKER (J. E.). The germicidal properties of chemically pur soaps. *J. inf. dis.*, **38**, 1926, p. 127.
302. — WALTERS (T. W.). *Am. J. Pub. Health.*, **7**, 1917, p. 1030, d'après TANNER and WALLACE.
303. — WATSON (H. E.). A note on the variation of the rate of disinfection with change in the concentration of the desinfectant. *J. of. Hyg.*, **8**, 1908, p. 536.
304. — WEIL (R.). Künstliche Herstellung von Sporentesmaterial von einem bestimmten Resistenzgrade gegen strömenden Dampf, zur einheitlichen Ermittlung von Desinfektionswerten. *Cent. f. Bakt.*, **30**, 1901, s. 500 und 526.
305. — WEYLAND und RÖMER. In KOLLE, KRAUSS und UHLENHUTH, d'après] BÜRGI und LAUBENHEIMER.
306. — WEYRAUCH. Zur vergleichende Prüfung von Desinfektionsmitteln. *Cent.f. Bakt.*, I. or. **103**, 1927.
307. — WILSON et SCHERRER, d'après DUTHOIT.
308. — WINSLOW (E. C. A.) and FALK (I.). The influence of calcium and sodium salts at various hydrogen ion concentration upon viability of bact. Coli. *J. of. Bact.*, **8**, 1923, p. 215.
309. — WINSLOW (C. E. A.) and LOCKRIDGE (E.). The toxic effect of certain acids upon colon and typhoid bacilli in relation to their degree of dissociation. *J. inf. dis.*, **3**, 1906, p. 547.
310. — WOODHEAD and PONDER. *The Lancet*, **2**, 1909, p. 1516.
311. — WRIGHT. Report on the com. on standard methods of examining Desinfectants. *Am. J. Pub. Health*, **8**, 1918, 506, et *J. of. Bact.*, **2**, 1917, p. 315.

Z

312. — ZETZNOV. Ueber ein Vorkommen von sehr Widerstandfähigen Bacillensporen. *Cent. f. Bakt.*, I. or. **66**, 1912, s. 131.
313. — ZIKES (H.). Eine neue Methode zur Prüfung von Desinfektionsmitteln gegen Mikroorganismen. *Cent. f. Bakt.*, 2 Abt., **13**, 1904, s. 543.
314. — ZÖLLER und EATON. *Abst. Bact.*, **7**, 1923, n° 17, d'après TANNER et WALLACE.
-

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION	XIII
--------------------	------

CHAPITRE PREMIER

NOTIONS GÉNÉRALES SUR LA MESURE DU POUVOIR ANTIMICROBIEN.....	1
I. — <i>Détermination de la valeur antigénétique d'une substance chimique.....</i>	5
II. — <i>Détermination de la valeur antibiotique d'une substance chimique.....</i>	10
Vue générale	10
A. Méthodes des porte-germes.....	12
B. Méthodes des suspensions.....	19
1° Méthodes du coefficient phénol.....	23
2° Méthodes des suspensions sans essai comparatif.....	50
C. Méthodes permettant d'apprécier le pouvoir de diffusion des antiseptiques.....	52
D. Formules mathématiques exprimant le pouvoir antiseptique.....	55
E. Appréciation de l'influence exercée sur une fonction biochimique des bactéries.....	59
F. Méthodes tendant à établir simultanément l'activité antimicrobienne et le degré de nocivité pour les tissus.....	60

CHAPITRE II

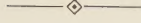
A. FACTEURS INFLUENÇANT LA DÉTERMINATION DU POUVOIR ANTIBIOTIQUE.....	66
I. — <i>Facteurs liés au désinfectant.....</i>	66
II. — <i>Facteurs liés à l'organisme microbien en expérience.....</i>	67
a. Influence du nombre de germes traités par le désinfectant.....	67
Travaux antérieurs. Essais personnels.....	73
b. Facteurs dépendant des qualités de l'organisme utilisé.....	78
Travaux antérieurs. Essais personnels.....	78
1° Influence de l'Espèce microbienne.....	79
2° Influence de la Souche microbienne.....	83
3° Influence de l'Age de la culture.....	85
c. Influence du milieu de suspension des germes.....	99
III. — <i>Facteurs liés à la nature du milieu intermédiaire.....</i>	102
a. Influence des matières salines, et plus particulièrement du chlorure de sodium sur l'action désinfectante.....	103
b. Influence de l'albumine sur l'action désinfectante.....	105
IV. — <i>Facteurs dépendant des conditions extérieures à l'essai.....</i>	106
a. Influence de la température de l'essai.....	106
Travaux antérieurs. Essais personnels.....	108
b. Influence du temps de contact entre l'antiseptique et les germes.....	110
V. — <i>Facteurs pouvant modifier la deuxième phase de l'action antibiotique : l'essai de survie des germes. Conditions de la subculture.....</i>	116
Travaux antérieurs. Essais personnels.....	120
VI. — <i>Le choix de la variable dans la mesure de l'action antibiotique.....</i>	123

B. FACTEURS INFLUENÇANT PLUS PARTICULIÈREMENT LA DÉTERMINATION DU POUVOIR ANTIGÉNÉTIQUE.....	127
C. INFLUENCE DU POUVOIR ANTIGÉNÉTIQUE SUR LA DÉTERMINATION DU POUVOIR ANTIBIOTIQUE.....	131

CHAPITRE III

I. — <i>Techniques générales communes à nos méthodes de mesure de l'activité anti- microbienne</i>	139
1° Préparation des solutions désinfectantes destinées aux essais.....	139
2° Préparation des germes pour l'essai. Préparation des suspensions micro- biennes et numération des germes qu'elles contiennent. Réalisation des suspensions titrées.....	139
a. Préparation des germes.....	139
b. Préparation des suspensions microbiennes.....	140
c. Numération des germes.....	140
α. Préparation et numération de l'émulsion de levure.....	143
β. Préparation et coloration du mélange : [suspension de levure-émul- sion microbienne].....	144
γ. Numération des éléments et calcul des résultats.....	144
3° Préparation des milieux de culture.....	145
4° Préparation des milieux où se fait le contact de l'antiseptique et des germes.....	148
5° Évaluation des résultats de l'essai.....	149
II. — <i>Détermination de la dose antigénétique d'une substance chimique</i>	150
Exposé de la technique. Exemples détaillés. Exposé général des résultats....	151
III. — <i>Détermination de la dose antibiotique d'une substance chimique par la technique « directe », avec évaluation de la validité de l'essai</i>	154
A. Exposé de la technique directe. Exemples détaillés.....	154
1° Détermination de la dose antibiotique vis-à-vis du staphylocoque doré. En eau distillée.....	155
En eau physiologique.....	157
En milieu albumineux.....	158
En bouillon peptoné salé.....	159
2° Détermination de la dose antibiotique vis-à-vis du colibacille.....	159
3° Détermination de la dose antibiotique vis-à-vis du bacille diphtérique. 4° Détermination de la dose antibiotique vis-à-vis des spores de <i>Bacillus</i> <i>subtilis</i>	160
B. Exposé des résultats. Valeurs antibiotiques de quelques corps chimiques..	160
C. Quelques remarques à propos des valeurs obtenues.....	164
D. Expériences effectuées pour apprécier le degré de régularité des résultats obtenus.....	170
E. Évaluation de la validité de l'essai antibiotique par la technique directe.	172
IV. — <i>Méthode de détermination de la valeur antibiotique comportant l'utilisation des techniques de centrifugation</i>	178
A. Exposé de la technique.....	178
B. Expériences effectuées pour apprécier le degré de régularité des résultats obtenus.....	182
V. — <i>Comparaison des résultats obtenus avec la technique directe et la technique par centrifugation. Conclusion</i>	185
RÉSUMÉ.....	189
BIBLIOGRAPHIE.....	191

DEUXIÈME THÈSE



Propositions données par la Faculté

1^o STRUCTURE DES BACTÉRIES

2^o LES LIPIDES DU BACILLE TUBERCULEUX

Vu et approuvé :

Paris, le 21 mars 1933.

Le doyen de la Faculté des sciences,

Ch. MAURAIN.

Vu et permis d'imprimer :

Le Recteur

de l'Académie de Paris,

S. CHARLÉTY.

